

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Biochemie



**Bc. Katarína Šprláková**

Výskyt purinergních receptorů P2 a jejich úloha v intracelulární vápníkové signalizaci  
neonatálních hypofyzárních buněk

Expression of purinergic P2 receptors and their role in intracellular calcium signaling of  
neonatal pituitary cells

Diplomová práce

prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

RNDr. Hana Zemková, CSc

Praha 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 09.05.2014

Podpis

**Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla upřímně poděkovat prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. a školitelce RNDr. Haně Zemkové, CSc. za možnost uskutečnit tuto práci, za jejich odborné vedení a podporu, dále své rodině, manželovi a dětem za jejich trpělivost a podporu. Děkuji také Ing. Haně Janouškové, Mgr. Vojtěchu Vávrovi, PhD. a Zdence Pavliščové z Fyziologického ústavu AVČR, kde jsem práci vypracovala, za jejich pomoc a ochotu.

## **Abstrakt**

Tato diplomová práce je zaměřena na studium výskytu purinergních receptorů P2X a P2Y v buňkách neonatální adenohypofýzy. Purinergní receptory jsou aktivovány navázáním extracelulárního ATP a jejich aktivace vede k zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů. Cílem této práce bylo metodou mikrofluorimetrie zjistit, jestli neonatální hypofyzární buňky obsahují purinergní receptory. Také byl sledován vliv různých agonistů a antagonistů purinergních receptorů na intracelulární koncentraci iontů  $\text{Ca}^{2+}$  v buňkách neonatální hypofýzy. Radioimunologickým měřením byl sledován účinek extracelulárního ATP na sekreci luteinizačního hormonu a porovnán s účinkem hormonu GnRH. V práci bylo zjištěno, že neonatální buňky hypofýzy jsou na přítomnost extracelulárního ATP méně citlivé než buňky dospělé hypofýzy, ale relativní citlivost k dalším agonistům purinergních receptorů je podobná jako u dospělé hypofýzy. Ve smíšené populaci neonatálních hypofyzárních buněk byly identifikovány purinergní receptory P2X citlivé k ATP a 2 MeSATP, jako i receptory P2Y citlivé k ADP. Dále byly identifikovány receptory P2X<sub>7</sub> citlivé k BzATP, receptory P2X<sub>2</sub> reagující na PPADS a receptory P2X<sub>4</sub> reagující na BDBD. Nakonec bylo prokázáno, že extracelulární ATP může i v nepřítomnosti hormonu GnRH zvyšovat bazální sekreci luteinizačního hormonu.

**Klíčová slova:** purinergní receptory P2X a P2Y, neonatální hypofyzární buňky, extracelulární ATP, intracelulární koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$

## **Abstract**

This diploma thesis focuses on study of the expression of purinergic receptors P2X and P2Y in the cells of neonatal adenohypophysis. Purinergic receptors are activated by binding of extracellular ATP and their activation leads to an increase in intracellular concentrations of calcium ions. The aim of this thesis was to determine by microfluorimetry method whether neonatal pituitary cells contain purinergic receptors. In addition, the influence of various agonists and antagonists of purinergic receptors on intracellular concentrations of ions  $\text{Ca}^{2+}$  in neonatal pituitary cells was monitored. The influence of extracellular ATP on secretion of a luteinizing hormone was observed by radioimmunoassay and it was compared with the effect of a hormone GnRH. It was found that neonatal pituitary cells are less sensitive to extracellular ATP than adult pituitary cells, but the relative sensitivity to other agonists of purinergic receptors is similar to the one of adult pituitary cells. In the mixed population of neonatal pituitary cells there were identified ATP- and 2 MeSATP-sensitive purinergic receptors P2X, as well as ADP-sensitive receptors P2Y. Further, the BzATP-sensitive receptors P2X<sub>7</sub>, PPADS-sensitive receptors P2X<sub>2</sub> and BDBD-sensitive receptors P2X<sub>4</sub> were identified. Finally, it was proved that extracellular ATP can increase basal secretion of luteinizing hormone even in the absence of the hormone GnRH.

**Key words:** purinergic receptors P2X and P2Y, neonatal pituitary cells, extracellular ATP, intracellular concentration of ions  $\text{Ca}^{2+}$

„(In Czech)”

## Obsah

Přehled nejdůležitějších zkratk	3
1 Úvod	6
1.1 Hypotalamo-hypofyzární systém	6
1.1.1 Neurohormony hypotalamu regulující adenohipofýzu	6
1.1.2 Hypofýza a hormony adenohipofýzy	7
1.1.3 Mechanismus účinku hormonů GnRH a TRH mobilizujících ionty $\text{Ca}^{2+}$	7
1.2 Úloha extracelulárního ATP v organismu	10
1.2.1 Cesta ATP do extracelulárního prostoru	10
1.2.2 Extracelulární metabolismus ATP a dalších nukleotidů	12
1.2.3 Úloha iontů $\text{Ca}^{2+}$ v buněčných dějích	13
1.3 Purinergní receptory	15
1.3.1 Receptory P1	15
1.3.2 Receptory P2	16
1.4 Purinergní signalizace a její funkce v dospělé hypofýze	19
1.4.1 Extracelulární ATP a hypofýza	19
1.4.2 Expres transkriptů receptorů P2X v buňkách předního laloku hypofýzy	21
1.4.3 Identifikace funkčních receptorů P2X v buňkách hypofýzy dospělého potkana	23
1.4.4 Receptory P2X a vstup iontů $\text{Ca}^{2+}$ citlivý a necitlivý k napětí	26
1.4.5 Receptory P2Y a adenosinové receptory v hypofýze	27
1.5 Specifické vlastnosti neonatálních gonadotropních buněk	28
1.6 Měření koncentrace intracelulárních iontů vápníku	29
1.6.1 Fluorescenční sonda Fura-2	30
1.6.2 Kalibrace fluorescenčního signálu	33
1.6.2.1 Určení disociační konstanty barviva ze sondy Fura-2	36
1.7 Imunoradioizotopové metody pro stanovení sekrece LH	36
2 Cíl práce	41
3 Materiál a metody	42
3.1 Příprava buněk z hypofýzy potkana	42
3.1.1 Příprava roztoků	42
3.1.2 Izolace buněk z hypofýzy	43
3.2 Vlastní měření koncentrace intracelulárních iontů vápníku metodou mikrofluorimetrie	44

3.2.1 Použité přístroje .....	44
3.2.2 Roztoky pro měření koncentrace intracelulárních iontů vápníku .....	45
3.2.3 Fluorescenční měření změn koncentrace volných iontů $\text{Ca}^{2+}$ .....	47
3.2.4 Zpracování dat.....	48
3.3 Stanovení LH metodou RIA.....	49
3.3.1 Princip metody .....	49
3.3.2 Roztoky a přísady pro stanovení sekrece LH metodou RIA .....	50
3.3.3 Postup měření RIA .....	51
3.3.4 Vyhodnocení metody RIA .....	53
3.4 Statistická analýza.....	54
4 Výsledky .....	55
4.1 Citlivost buněk neonatální adenohipofýzy k ATP, GnRH a TRH .....	55
4.2 Citlivost GnRH- a TRH-citlivých buněk k ATP .....	57
4.3 Porovnání citlivosti smíšené populace neonatálních hypofyzárních buněk na aplikaci ATP a dalších agonistů purinergních receptorů .....	58
4.4 Rozdíl mezi TRH- a GnRH-citlivými buňkami v jejich reakci na aplikaci ADP .....	60
4.5 Vliv inhibitorů receptorů P2X na hladinu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zvýšenou po aplikaci ATP v neonatálních hypofyzárních buňkách .....	61
4.6 Rozdíl mezi TRH- a GnRH-citlivými buňkami v jejich citlivosti k BDBD .....	63
4.7 Účinek ATP na sekreci LH .....	64
5 Diskuse.....	66
5.1 Neonatální hypofyzární buňky a jejich citlivost k ATP.....	66
5.2 Rozlišení purinergních receptorů v různých typech buněk neonatální adenohipofýzy .....	68
5.3 Vliv inhibitorů na purinergní receptory buněk neonatální hypofýzy .....	70
5.4 Stanovení LH metodou RIA.....	70
6 Závěr .....	72
7 Souhrn .....	73
Použitá literatura .....	75

## **Přehled nejdůležitějších zkratk**

**$\alpha\beta$ meATP** –  $\alpha\beta$ -methylen-ATP

**2 MeSATP** – 2-methylthio-ATP

**Ab** - protilátka

**ACTH** – adrenokortikotropní hormon

**Ag; Ag\*** - antigen; radioaktivně značený antigen

**AMP; ADP; ATP** – adenosin-5'-monofosfát; adenosin-5'-difosfát; adenosin-5'-trifosfát

**ATP $\gamma$ S** - adenosin-5'-( $\gamma$ -thio)-trifosfát

**BAPTA** – kyselina 1,2-bis-(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctová

**BDBD** – 5-(3-bromfenyl)-1,3-dihydro-2H-benzofuro[3,2-e]-1,4-diazepin-2-on

**BSA** – „bovine serum albumin“ – hovězí sérový albumin

**BzATP** – 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl-ATP

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** – intracelulární koncentrace vápenatých iontů

**cAMP** – cyklický adenosin-3',5'-monofosfát

**CCD kamera** – „Charge-Coupled Device“ – kamera obsahující čip CCD pracující na principu fotoefektu

**cDNA** – „complementary“ DNA – DNA vzniklá reverzní transkripcí z RNA do DNA

**CRH** – hormon uvolňující kortikotropin

**DAG** – diacylglycerol

**EBSS** – „Earle's balanced salt“ – Earleho balanční sůl

**ECS** – extracelulární roztok

**EDTA** – ethylendiamintetraoctová kyselina

**EGTA** – ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)tetraoctová kyselina

**E-NPPázy** – ekto-nukleotidpyrofosfatázy/fosfodiesterázy

**E-NTPDázy** – ekto-nukleosidtrifosfátdifosfohydrolázy

**F340/F380** – poměr intenzit fluorescence při excitaci v 340 nm a 380 nm

**FBS** – „fetal bovine serum“ – fetální hovězí sérum; telecí sérum

**FSH** – hormon stimulující folikuly

**Fura-2**, resp. **Fura-2 AM** – fluorescenční sonda citlivá na ionty  $\text{Ca}^{2+}$ , resp. její acetoxymethylester

**GH** – růstový hormon

**GH<sub>3</sub>** – buněčné linie odvozené od potkaních somatotropů produkující GH a PRL

**GHRH** – hormon uvolňující růstový hormon

**GnRH** – hormon uvolňující gonadotropiny

**GnRHR**- receptor pro GnRH

**GT1** – imortalizované myší neurony uvolňující GnRH

**GDP; GTP** – guanosin-5'-difosfát; guanosin-5'-trifosfát

**HEK293** – epiteliální buňky odvozené z lidských embryonálních buněk ledvin

**IP<sub>3</sub>** – inositol-1,4,5-trifosfát

**LH** – luteinizační hormon

**LHRH** – hormon uvolňující luteinizační hormon

**M199** – medium 199 – pufr, roztok pro inkubaci hypofyzárních buněk

**mRNA** – mediátorová RNA; „mesenger“ RNA

**NRS** – „normal rabbit serum“ – králíčí sérum

**P2X** – ionotropní purinergní receptor



**P2Y** – metabotropní purinergní receptor

**PCR** – polymerázová řetězová reakce

**PEG** – polyethylenglykol

**PIP<sub>2</sub>** – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát

**PKC; cPKC; nPKC** – proteinkináza C; isoformy PKC závislé na Ca<sup>2+</sup>; isoformy PKC nezávislé na Ca<sup>2+</sup>

**PLA<sub>2</sub>** – fosfolipáza A<sub>2</sub>

**PLC** – fosfolipáza C

**PLD** – fosfolipáza D

**POMC** – proopiomelanokortin

**PPADS** – pyridoxal-5'-fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonát

**PRL** – prolaktin

**RIA** – radioimunoanalýza

**RT-PCR** – „real-time“ polymerázová řetězová reakce

**STH** – somatotropní hormon

**TI** – trypsinový inhibitor

**TM1 a TM2** – transmembránová doména 1 a 2

**TRH** – hormon uvolňující tyreotropin

**TRHR** – receptor pro TRH

**Tris** - trisaminomethan

**TSH** – tyreotropní hormon

**UDP; UTP** – uridin-5'-difosfát; uridin-5'-trifosfát

# 1 Úvod

## 1.1 Hypotalamo-hypofyzární systém

Hypotalamus a hypofýza hrají centrální úlohu v endokrinním systému, který kontroluje rozmnožování, laktaci, růst, vývoj, metabolismus a stresové reakce. Hypotalamické neurony produkují stimulační a inhibiční neurohormony (liberiny a statiny), které regulují aktivitu hypofýzy (Tab. 1). Hypofýza pak svými tropními hormony stimuluje aktivitu periferních endokrinních žláz – štítné žlázy, nadledvin a pohlavních žláz, které produkují hormony působící přímo na cílové tkáně.

### 1.1.1 Neurohormony hypotalamu regulující adenohypofýzu

Hormony hypotalamu se syntetizují v různých hypotalamických jádrech, transportují se pomocí axonů do *eminentia mediana* a odtud se po uvolnění z nervových zakončení dostávají portálním kapilárním oběhem k přednímu laloku hypofýzy, kde stimuluje (liberiny) nebo inhibují (statiny) sekreci a biosyntézu příslušných hormonů (Tab. 1).

Mezi liberiny patří hormon uvolňující tyreotropin (TRH), který stimuluje biosyntézu tyreotropního hormonu (TSH) a prolaktinu (PRL). Jeho syntézu a sekreci inhibují hormony štítné žlázy mechanismem negativní zpětné vazby. Dále je to hormon uvolňující gonadotropiny (GnRH), označovaný také jako hormon uvolňující luteinizační hormon (LHRH), který stimuluje sekreci luteinizačního hormonu (LH) a hormonu stimulujícího folikuly (FSH). Další látka této skupiny je hormon uvolňující kortikotropin (CRH), který stimuluje syntézu adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a jeho prekurzoru proopiomelanokortinu (POMC). Mezi liberiny patří i hormon uvolňující růstový hormon (GHRH), který stimuluje sekreci a syntézu somatotropního hormonu (STH) neboli růstového hormonu (GH). Mezi statiny patří somatostatin, který inhibuje sekreci GH, PRL a TSH, a dopamin, který inhibuje sekreci PRL<sup>1</sup>.

Tabulka č. 1.: Přehled hypotalamických a adenohypofyzárních hormonů

Hypotalamické hormony	Počet aminokyselin	Hormony adenohypofýzy
TRH	3	stimulace TSH a PRL
GnRH	10	stimulace LH a FSH
CRH	41	stimulace ACTH a POMC (prekurzor ACTH)

GHRH	44	stimulace STH
somatostatin	14	inhibice STH a TSH
dopamin		inhibice PRL

### 1.1.2 Hypofýza a hormony adenohypofýzy

Hypofýza je uložena v tureckém sedlu klínové kosti. S hypothalamem je spojena stopkou. Skládá se ze dvou anatomicky a funkčně oddělených částí, laloků, které jsou odděleny septem. Přední lalok, adenohypofýza, je endodermálního původu, v rané ontogenezi se vyvinul ze stropu primitivní ústní dutiny; zadní lalok, neurohypofýza, má nervový původ a tvoří jej axony hypothalamických neuronů. Přední lalok neobsahuje nervová zakončení a je tvořen smíšenou populací sekrečních hypofyzárních buněk, které syntetizují adenohypofyzární hormony (Tab. 1) a uvolňují je přímo do krevního oběhu. Zadní lalok obsahuje nervová zakončení hypothalamických neuronů sekretující oxytocin a vasopresin<sup>1</sup>.

V adenohypofýze je pět základních typů buněk, které produkují hormony. Jsou to somatotropní buňky produkující GH, kterých je až 50 %. Dále pak laktotropní buňky produkující PRL, kortikotropní buňky produkující ACTH, tyreotropní buňky produkující TSH a gonadotropní buňky produkující LH a FSH.

Hormony hypothalamu a hypofýzy patří do skupiny peptidových hormonů. Jde o malé peptidy až bílkoviny (Tab. 1), které se syntetizují z vysokomolekulárních prekurzorů – preprohormonů v drsném endoplasmatickém retikulu endokrinních buněk. Po odštěpení části peptidu se jako prohormony dostávají do Golgiho aparátu a odtud do sekrečních granul, kde se proteolytickým štěpením vytváří konečná molekula hormonu<sup>1</sup>.

### 1.1.3 Mechanismus účinku hormonů GnRH a TRH mobilizujících ionty $\text{Ca}^{2+}$

Hormony proteinového nebo peptidového charakteru jsou dobře rozpustné ve vodě a tak při transportu krví zpravidla nepotřebují nosiče. Těžko však procházejí lipidovou vrstvou membrán, proto se v cílové tkáni, na vnější straně buněčné membrány, nejprve navazují na specifické membránové receptory spřažené s G-proteiny, čímž se spouští kaskáda jejich vnitrobuněčných účinků. Navázání hormonu na membránový receptor podmiňuje vznik druhých posílů, které vyvolávají další změny. Aktivace membránových receptorů pro hormony GnRH a TRH má za následek dvoufázové zvýšení cytoplasmatické koncentrace

iontů  $\text{Ca}^{2+}$ : v první fázi dochází k uvolnění, neboli mobilizaci iontů  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních zásob, a ve druhé ke vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  z extracelulárního prostoru do buňky<sup>2</sup>.

GnRH je dekapeptid, který se váže na specifické receptory (GnRHR) spřažené s G-proteiny a kontroluje sekreci a syntézu LH a FSH v gonadotropních buňkách. Gonadotropie představují jenom kolem 10 % hypofyzárních buněk. Dělí se na monohormonální buňky (18 % buněk tvoří pouze LH a 22 % buněk pouze FSH) a multihormonální buňky (60 % buněk tvoří LH i FSH). Savčí GnRH byl poprvé izolován asi před 40 lety. Jeho sekvence je následující: pGlu – His – Trp – Ser – Tyr – Gly – Leu- Arg – Pro – Gly –  $\text{NH}_2$ <sup>2</sup>.

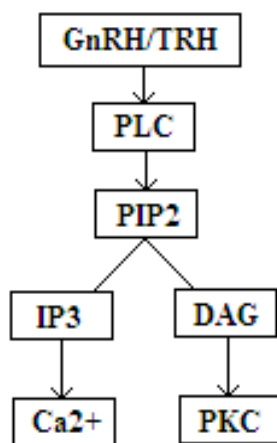
GnRHR má sedm transmembránových domén. Známé jsou dva typy receptorů GnRH. Typ I GnRHR, nacházející se u savců, je jedinečný v tom, že mu chybí cytoplasmatický C-terminální konec a je rezistentní k desensitizaci receptoru. Typ II GnRHR, vyskytující se u mnoha obratlovců, obsahuje C-konec a vykazuje rychlou desensitizaci receptoru<sup>3</sup>.

G-proteiny jsou heteromerické proteiny složené z podjednotky  $\alpha$  ( $G_\alpha$ ) a dimeru složeného z podjednotek  $\beta$  a  $\gamma$  ( $G_{\beta\gamma}$ ). Aktivované GnRHR se spojují s G-proteiny a stimulují uvolnění GDP z podjednotky  $G_\alpha$ . GDP je rychle nahrazeno GTP, přičemž navázání GTP způsobí disociaci podjednotek  $G_\alpha$  a  $G_{\beta\gamma}$ . G-proteiny rozdělujeme podle typu podjednotky  $G_\alpha$  do čtyř skupin:  $G_s$  (stimuluje adenylátcyklázu a tvorbu cAMP),  $G_i$  (inhibuje adenylátcyklázu a aktivuje receptorové tyrosinkinázy),  $G_{q/11}$  (aktivuje fosfolipázu C) a  $G_{12/13}$  (stimuluje proteinové tyrosinkinázy)<sup>4</sup>.

GnRHR je spojený s proteinem  $G_{q/11}$  a aktivuje postupně tři rozdílné fosfolipázy, které poskytují ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a molekuly druhých messengerů odvozené od lipidů. Nejdříve je aktivována fosfolipáza C (PLC), následovaná aktivací fosfolipázy  $A_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) a fosfolipázy D (PLD). Rychlá hydrolyza fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu ( $\text{PIP}_2$ ) fosfolipázou C (5-30 s) má za následek vznik dvou druhých poslů inositol-1,4,5-trifosfátu ( $\text{IP}_3$ ) a diacylglycerolu (DAG).  $\text{IP}_3$  může mobilizovat  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních zásob a DAG aktivuje proteinkinázu C (PKC) (Obr. 1, s. 9). Po krátkém zpoždění (asi 1-2 min) je aktivována  $\text{PLA}_2$ , což se projeví uvolněním arachidonové kyseliny z buněčných fosfolipidů. GnRH aktivuje také PLD a podobně jako v případě  $\text{PLA}_2$  tato aktivace má zpoždění za aktivací PLC přibližně 2 minuty. „Časný“ DAG a ionty  $\text{Ca}^{2+}$  pocházející z aktivace PLC mohou spolu aktivovat isoformy proteinkinázy C závislé na  $\text{Ca}^{2+}$  (cPKC). Naopak, „pozdní“ DAG (pocházející z aktivace PLD) může aktivovat isoformy PKC nezávislé na  $\text{Ca}^{2+}$  (nPKC). Některé specifické isoformy PKC může aktivovat také kyselina arachidonová, olejová, linolová a linolenová (odvozené od  $\text{PLA}_2$ ).

Ionty  $\text{Ca}^{2+}$  jsou důležitým intracelulárním poslem, který reguluje různé fyziologické procesy. GnRH způsobuje rychlou intracelulární mobilizaci iontů  $\text{Ca}^{2+}$  (z vnitřních zásob sensitivních na  $\text{IP}_3$ ) následovanou vstupem extracelulárních iontů  $\text{Ca}^{2+}$  přes  $\text{Ca}^{2+}$ -kanály řízené napětím. Jeho signalizace přetrvává dokud  $\text{IP}_3$  uvolňuje ionty  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních zásob. GnRH v gonadotropech hypofýzy stimuluje oscilující „vápníkové odpovědi“, které můžeme rozdělit do tří skupin: podprahové odpovědi, bazální oscilace a dvoufázové odpovědi složené z jedné velké odpovědi (označované jako monofázová) následované bazálními oscilacemi. Hladiny cytoplasmatických iontů  $\text{Ca}^{2+}$  v gonadotropech jsou regulovány frekvencemi oscilací, které se liší v požadavcích na aktivaci receptoru a produkci  $\text{IP}_3$ .  $\text{Ca}^{2+}$ -oscilace, které jsou vyvolané GnRH, jsou asociovány s tvorbou a sekrecí gonadotropinů, ale mechanismus zodpovědný za tyto oscilace není zatím znám<sup>2,4</sup>.

TRH je tripeptid vykonávající své biologické účinky stimulací membránových receptorů, které také patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny. Jsou známy dva typy receptorů TRH (TRHR), označované jako TRH-R1 a TRH-R2. Pro savčí TRH byla určena sekvence Glu-His-Pro- $\text{NH}_2$ . TRH v hypofýze stimuluje biosyntézu tyreotropního hormonu a prolaktinu. Mechanismus účinku TRH je stejný jako v případě GnRH. Vazba TRH na protein  $\text{G}_{q/11}$  aktivuje PLC, která následně stimuluje hydrolýzu  $\text{PIP}_2$  na  $\text{IP}_3$  a DAG. Tyto druží poslové stimulují zvýšení intracelulárních iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a aktivaci PKC<sup>5,6</sup> (Obr. 1).



**Obrázek č. 1.: Mechanismus účinku hormonů GnRH a TRH.** Vazba GnRH nebo TRH na specifický receptor, GnRHR nebo TRHR, spřažený s proteinem  $\text{G}_{q/11}$  vede k aktivaci fosfolipázy C (PLC), která stimuluje hydrolýzu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu ( $\text{PIP}_2$ ) na inositol 1,4,5-trifosfát ( $\text{IP}_3$ ) a diacylglycerol (DAG). Tyto druží poslové stimulují zvýšení koncentrace intracelulárních iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a aktivaci proteinkinázy C (PKC).

## 1.2 Úloha extracelulárního ATP v organismu

Extracelulární puriny jsou považovány za nejstarší epigenetické faktory, které hrají důležitou biologickou roli v různých tkáních<sup>7</sup>. Adenosin-5'-trifosfát (ATP) je biologická molekula přítomná ve všech buňkách a intracelulárních organelách, včetně sekrečních váčků. Kromě toho se ale nachází také v extracelulárním prostoru. Extracelulární ATP je signální molekula centrální a periferní nervové soustavy, spouští širokou škálu reakcí, včetně neurotransmise, sekrece hormonů a vnímání bolesti. ATP je také růstový faktor podílející se na buněčné proliferaci, diferenciaci, regeneraci a buněčné smrti<sup>8</sup>.

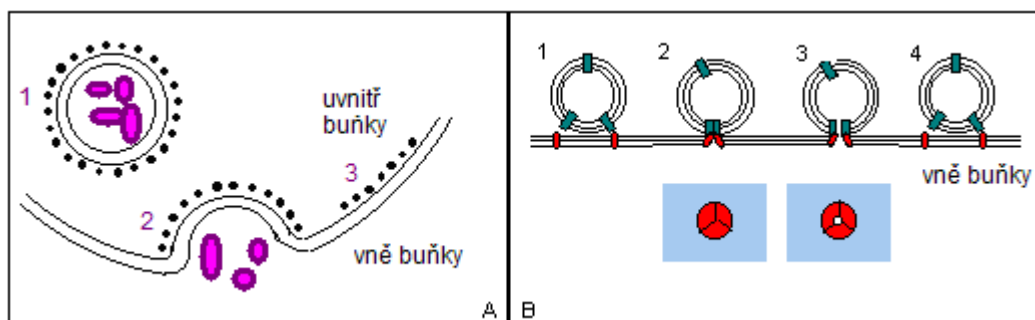
Dlouho převládal výrazný odpor k představě, že ATP by mohl mít nějakou extracelulární fyziologickou funkci. Hlavní argument byl, že buňky by přece neuvolňovaly biomolekulu tak důležitou k životu. Dalším argumentem byla i skutečnost, že ATP vzhledem ke své molekulární velikosti a náboji nemůže procházet přes plasmatickou membránu prostou difuzí. Původně se také předpokládalo, že za extracelulární účinky purinů jsou zodpovědné především degradační produkty ATP, adenosin a adenosin-5'-monofosfát (AMP) a adenosin-5'-difosfát (ADP).

Jako zdroj extracelulárního ATP byly zpočátku považovány poškozené nebo umírající buňky. Avšak dnes je jasné, že mnoho typů buněk může uvolňovat ATP i fyziologicky, v reakci na mechanickou distorzi, hypoxii nebo účinky některých látek<sup>9</sup>.

### 1.2.1 Cesta ATP do extracelulárního prostoru

Způsob, jakým se ATP dostává ze zdravých buněk do mezibuněčného prostoru, nebyl ještě dostatečně objasněn. Nebyly objeveny žádné specifické kanály nebo přenašeče, které by tuto molekulu transportovaly z buňky ven. Jednoznačným zdrojem ATP jsou poškozené buňky, jejichž obsah se volně vylévá do mezibuněčného prostoru. Nicméně to nemůže být jediný zdroj<sup>10</sup>. Zjistilo se, že k uvolňování cytoplasmatického ATP z nepoškozené buňky nedochází narušením membrány, ale jedná se o aktivní proces.

ATP je v buňkách uložen v zásobních granulích a různých váčcích spolu s jinými přenašeči nebo se nachází volně v cytoplasmě. Zásobní granula i váčky mohou být přisunuty k membráně a jejich obsah může být uvolněn z buňky do extracelulárního prostoru dvěma způsoby: exocytózou nebo mechanismem „kiss and run“.



**Obrázek č. 2: Mechanismy uvolňování ATP ze zásobních váčků a granul z buňky**

**A.** Exocytóza. Váček s obsahem určeným k vyloučení z buňky (1) se přiblíží k cytoplasmatické membráně a po splynutí membrány váčku s cytoplasmatickou membránou dojde k uvolnění jeho obsahu z buňky (2). Následuje recyklace membrány váčku (3). **B.** Mechanismus „kiss and run“. Váček s obsahem určeným k vyloučení z buňky se přiblíží k cytoplasmatické membráně (1), následuje „nasednutí“ váčku na membránu a vytvoření póru (2), po otevření póru dojde k uvolnění látky (3), odloučení váčku od membrány (4) a návratu vyprázdněného váčku do cytoplasmy. Ve váčku vzniklý pór se po návratu do cytoplasmy uzavře (spodní řádek). Převzato z Tvrdoňová V. (2008)<sup>11</sup>.

Při exocytóze (Obr. 2A) dochází k dočasnému splynutí membrány váčku s plasmatickou membránou a obsah váčku se vylíje mimo buňku. Následuje endocytóza, při které se membrána váčku vchlípí, váček se znovu vytvoří a putuje zpět do cytoplasmy, kde je znovu naplněn. Dojde-li k uvolnění mechanismem „kiss and run“ (Obr. 2B), vytvoří se dočasně pór přes membránu váčku i plasmatickou membránu, kterým je obsah váčku transportován do mimobuněčného prostoru, a celý váček se potom navrácí do cytoplasmy k dalšímu naplnění. Exocytóza je ovládána pomocí iontů  $\text{Ca}^{2+}$ , které jsou nezbytné pro splynutí membrány váčku a plasmatické membrány<sup>11</sup>.

Exocytózou se ATP vylévá ze synaptických váčků neuronů spolu s neurotransmitery, jakými jsou například glutamát, kyselina  $\gamma$ -aminomáselná nebo acetylcholin. ATP se uvolňuje do extracelulárního prostoru také z neuroendokrinních buněk při sekreci hormonů, z krevních destiček při aktivaci kaskády vedoucí ke srážení krve, z buněk imunitního systému a z epiteliálních buněk. ATP je ale uvolňován i z nesekretujících buněk. Mechanismus tohoto uvolňování cytoplasmatického ATP zatím není znám<sup>10</sup>.

Koncentrace cytoplasmatického ATP v buňkách je běžně více než 5 mM, přičemž značná část může být uvolněna mimo buňku, aniž by byla ohrožena její životaschopnost. ATP může v extracelulárním prostoru také vznikat, například vnitřní přeměnou jiných nukleotidů. Vytváří se působením enzymů přítomných jak v séru, tak na cytoplasmatické membráně buněk. Jako příklad lze uvést ekto-nukleosiddifosfokinázu ( $\text{ADP} + \text{UTP} \leftrightarrow$

ATP + UDP) či ekto-ATP:AMPfosfotransferázu ( $2\text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ ). Takto vzniklé množství ATP ale není příliš velké, podílí se na aktivaci receptorů jen velmi malou měrou<sup>12</sup>.

### 1.2.2 Extracelulární metabolismus ATP a dalších nukleotidů

V mezibuněčném prostoru se nalézá ATP a jiné purinové nukleotidy v koncentraci mnohem menší, než je jejich intracelulární koncentrace (v rozmezí 1-200  $\mu\text{M}$ ). Na povrchu buněk jsou totiž přítomny enzymy, které zprostředkují metabolismus těchto nukleotidů. Extracelulární koncentrace ATP a jiných purinových nukleotidů je však postačující k tomu, aby mohly aktivovat membránové proteiny na povrchu buněk, purinoreceptory.

Nukleotidy jsou hydrolyzovány kaskádou extracelulárních hydroláz, přičemž se tvoří příslušné nukleosidy a volné fosfáty. Ty mohou být recyklované obklopujícími buňkami nebo znova použité pro nukleotidovou resyntézu<sup>13</sup>.

V současnosti známe čtyři velké skupiny ektonukleotidáz zahrnující členy E-NTPDázové rodiny (ekto-nukleosidtrifosfátdifosfhydrolázy), E-NPPázové rodiny (ekto-nukleotidpyrofosfatázy/fosfodiesterázy), alkalické fosfatázy a ekto-5'-nukleotidázy, které mají širokou tkáňovou distribuci<sup>13</sup>. Jejich funkce jsou shrnuty v tabulce č. 2.

**Tabulka č. 2: Ektonukleotidázy, jejich funkce a produkty štěpení**

NÁZEV	FUNKCE
E-NTPDázy – ekto-nukleosidtrifosfátdifosfhydrolázy	hydrolyzují nukleosid-5'-trifosfáty a nukleosid-5'-difosfáty
E-NPPázy – ekto-nukleotidpyrofosfatázy/fosfodiesterázy	hydrolyzují cAMP na AMP, ATP na AMP + $\text{PP}_i$ , ADP na AMP + $\text{P}_i$ nebo $\text{NAD}^+$ na AMP a nikotinamidmononukleotid
Alkalické fosfatázy	uvolňují anorganický fosfát z nejrůznějších organických sloučenin obsahujících nukleotidy; hydrolyzují i pyrofosfát
ekto-5'-nukleotidázy	hydrolyzují nukleotid-5'-monofosfáty na nukleosid a $\text{P}_i$ , nebo adenosinové nukleotidy na adenosin

Katalytické místo ektonukleotidáz vyčnívá do extracelulárního prostoru. Jsou vázané na cytoplasmatickou membránu, ale existují i štěpné a rozpustné isoformy, které nazýváme exonukleotidázy. Maximální katalytická aktivita je přizpůsobená extracelulárnímu prostředí a vyžaduje přítomnost dvojmocných kationtů, jako je  $\text{Ca}^{2+}$  nebo  $\text{Mg}^{2+}$  a alkalické pH<sup>13</sup>.



### 1.2.3 Úloha iontů $\text{Ca}^{2+}$ v buněčných dějích

Vápenaté ionty jsou v buňce lokalizovány v organelách, nejvíce v endoplasmatickém (ve svalových vláknech sarkoplasmatickém) retikulu a mitochondriích, takže klidová koncentrace volných iontů  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) je pouze asi 100 nM. Oproti tomu v extracelulárním prostředí je koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$  mnohonásobně vyšší, běžně dosahuje koncentrace 2,3 – 2,9 mM. Tento nepoměr je udržován stálou činností  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní ATPázy ( $\text{Ca}^{2+}$ -pumpy) v plasmatické membráně a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -transportním systémem, který deportuje vápenaté ionty z buňky na úkor energie do buňky směřujícího gradientu sodných iontů v poměru 1  $\text{Ca}^{2+}$  : 3  $\text{Na}^+$ . Nízká koncentrace intracelulárních iontů  $\text{Ca}^{2+}$  je také udržována činností pumpy SERCA ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní ATPázy v SR) a mitochondriálního  $\text{Ca}^{2+}$ -jednocestného přenašeče (MCU – mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter), které čerpají ionty  $\text{Ca}^{2+}$  do buněčných organel<sup>14</sup>.

Ionty vápníku hrají významnou úlohu v přenosu signálů z vnějšího prostředí do buňky. Spektrum extracelulárních signálů je velice široké, ale jejich společným rysem je, že uvnitř buněk vyvolávají zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplasmě  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , které je charakteristické svým prostorovým výskytem a časovým průběhem. Uvnitř buněk pak ionty  $\text{Ca}^{2+}$  působí jako druhý posel na řadu enzymů a regulačních proteinů, které aktivují či inhibují další proteiny. Spouští se tak celá síť regulačních mechanismů, jejichž důsledkem může být zásah až na úrovni genové exprese. Zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  má význam zvláště při exocytóze synaptických váčků a sekrečních granul, při aktivaci svalové kontrakce, buněčného pohybu a v mnoha dalších procesech<sup>15</sup>.

Extracelulární signál, kterým může být změna membránového potenciálu nebo molekula neuropřenašeče, hormonu či jiného agonisty, je zachycen na vnější straně plasmatické membrány receptorem. Zachycení podnětu vyvolá v molekule receptoru konformační změny, které se projeví v její transmembránové části. První možností je, že touto transmembránovou částí receptoru je membránový iontový kanál, který se otevře a vyvolá tak rychlý a lokální vstup iontů  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky. Tímto mechanismem pracují iontové kanály aktivované napětím nebo ligandem. Druhou možností je, že transmembránová část molekuly receptoru je na vnitřní straně spřažena s některým G-proteinem, který uvolní svou mobilní katalytickou  $\alpha$ -podjednotku a ta aktivuje PLC, jako je tomu u signalizace GnRH a TRH (viz kapitola 1.1.3.). Uvnitř buňky tak dochází k mobilizaci intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ . Zvýšená koncentrace vnitrobuněčného vápníku vede

také k aktivaci mnoha enzymů a regulačních kaskád, při které hrají důležitou roli proteiny vázající ionty  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>14</sup>.

Základní součástí vápníkové signalizace jsou tedy iontové kanály, které svou přítomností v membránách podmiňují trvalý přísun iontů  $\text{Ca}^{2+}$  z extracelulárního prostředí. Rozpoznáváme  $\text{Ca}^{2+}$ -kanály řízené napětím a ligandem.

### **1.2.3.1 $\text{Ca}^{2+}$ -kanály řízené napětím**

Ve vzrušivých buňkách jsou přítomny  $\text{Ca}^{2+}$ -kanály řízené napětím, které reagují na depolarizaci membrány otevřením nebo zavřením selektivního póru v plasmatické membráně. Patří do velké rodiny kationových ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) kanálů s napěťovým senzorem. Při repolarizaci se rychle uzavírají a při dlouhodobé depolarizaci vykazují různé formy inaktivace. Jsou složeny ze 4 podjednotek ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$  a  $\delta$ ), funkčně je nejdůležitější podjednotka  $\alpha_1$ , která nese všechny hlavní znaky kanálu. Je tvořena čtyřmi homologními doménami, z nichž každá obsahuje 6 transmembránových segmentů (S1-S6). Segment S4 obsahuje řadu pozitivně nabitých aminokyselin (lysin a arginin) a tvoří napěťový senzor, segmenty S5 a S6 formují pór a tvoří selektivní filtr kanálu. Vlastní kanál má vysokou propustnost pro ionty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  a  $\text{Ba}^{2+}$ , zatímco dvojmocné ionty přechodných kovů, např.  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$ , průchod kompetitivně blokují. Podle velikosti změny napětí při depolarizaci, která otevře kanál, rozlišujeme vysocenapěťové („high-voltage activated“, HVA) a nízkonapěťové („low voltage activated“, LVA)  $\text{Ca}^{2+}$ -kanály. Význam  $\text{Ca}^{2+}$ -kanálů řízených napětím je především v tom, že jsou prostředníkem či „překladačem“ došlého signálu z elektrické podoby na podobu chemickou. Rychlé zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zprostředkované napěťovými  $\text{Ca}^{2+}$ -kanály hraje důležitou roli v excitabilitě nervových, svalových a hypofyzárních buněk, v synaptickém přenosu a v dějích svalové kontrakce a buněčné sekrece<sup>14</sup>.

### **1.2.3.2 $\text{Ca}^{2+}$ -kanály řízené ligandem**

Do této skupiny se řadí transmembránové proteiny, které po vazbě signální molekuly – ligandu na receptorovou část otevřou membránový kanál propustný pro ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a některé další ionty. Tyto proteiny nazýváme také ionotropní receptory. Velké množství receptorových kanálů je podmíněno různorodostí signálních molekul, typem a počtem různých podjednotek, ze kterých je receptor složen. Jedna molekula ligandu se zpravidla váže na několik různých receptorů, které se navzájem liší svým podjednotkovým složením

a dynamikou vedení iontů kanálem<sup>14</sup>. Iontové kanály řízené ligandem propustné pro ionty  $\text{Ca}^{2+}$  jsou například nikotinové acetylcholinové receptory, glutamátové receptory a purinergní receptory P2X aktivované extracelulárním ATP.

### 1.3 Purinergní receptory

Purinergní receptory tvoří relativně velkou a různorodou skupinu membránových proteinů. Tyto receptory jsou známy již od roku 1976, kdy byly poprvé definovány<sup>16,17</sup>. Reagují na koncentraci extracelulárního ATP, UTP a produkty jejich degradace: ADP, UDP a adenosin. Navázání některé z těchto molekul je pro receptor signálem k aktivaci, která většinou vede ke zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Receptorů, které k signalizaci využívají extracelulární nukleotidy, bylo identifikováno několik druhů. Purinergní receptory se tedy dělí do dvou hlavních podskupin, označovaných jako receptory P1 a P2.

#### 1.3.1 Receptory P1

Receptory P1 jsou známy pod názvem adenosinové receptory. Aktivace receptorů lze docílit buď neselektivně adenosinem, nebo selektivně použitím různých analogů adenosinu. Jedná se o receptory spážené s G-proteiny. Jsou složeny ze sedmi transmembránových domén, přičemž N-konec směřuje do extracelulárního prostoru, C-konec do intracelulárního prostoru<sup>16, 18</sup>.

Identifikovány byly čtyři subtypy adenosinových receptorů:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ <sup>19</sup>. Geny těchto receptorů obsahují ve své kódující oblasti introny, pozorován byl také polymorfismus, a to konkrétně u receptorů  $A_1$  a  $A_{2A}$ <sup>20</sup>. Subtyp  $A_1$  je nejrozšířenější v mozku a v kardiovaskulárním systému a vykazuje nejvyšší afinitu k adenosinu. V případě receptorů  $A_2$  byly klonovány dva podtypy,  $A_{2A}$  a  $A_{2B}$ , které mají k adenosinu nižší afinitu než receptor  $A_1$ . Receptory  $A_{2B}$  se vyskytují v celém lidském těle, ale jejich exprese v mozku a páteřní míše je nízká. Receptory  $A_{2A}$  jsou přítomné v zadním striatu, „nucleus accumbens“ a čichovém laloku – ve třech oblastech mozku s dopaminergní inervací. Receptor  $A_3$  se ve velké míře vyskytuje v plicích, játrech, ledvinách a přítomen je také v mozku. Jeho funkce zatím není dobře popsána. Ze všech adenosinových receptorů vykazuje k adenosinu nejnižší afinitu. Zatímco receptory  $A_1$  a  $A_2$  váží adenosin s nanomolární afinitou, receptor  $A_3$  potřebuje mikromolární koncentrace<sup>21, 22</sup>.

Aktivace adenosinových receptorů vede k modulaci bazální aktivity adenylátcyklázy. Receptory  $A_1$  a  $A_3$  jsou negativně spřaženy s adenylátcyklázovou signální dráhou prostřednictvím proteinu  $G_{i/o}$  sensitivního na toxin způsobující černý kašel („pertussis toxin“). Naopak,  $A_{2A}$  a  $A_{2B}$  stimulují aktivitu tohoto enzymu prostřednictvím proteinu  $G_s$  sensitivního k cholera-toxinu.  $A_{2B}$  také signalizuje prostřednictvím  $G_{q/11}$ -dependentní PLC. Intracelulární dráhy spouštěné těmito receptory zahrnují modulaci aktivity  $Ca^{2+}$ -kanálů a  $K^+$ -kanálů řízených napětím, ale také aktivaci dráhy MAP-kinasové rodiny signální transdukce<sup>23</sup>.

### 1.3.2 Receptory P2

Již v roce 1985 byly receptory P2, na základě jejich farmakologie, rozděleny na dvě podskupiny: P2X a P2Y<sup>16, 24</sup>. Rodina metabotropních receptorů P2Y je spřažená s G-proteinem a rodina receptorů P2X, které jsou ionotropní iontové kanály aktivované ligandem. Dále bylo funkčně charakterizováno a klonováno sedm podtypů rodiny receptorů P2X a osm podtypů rodiny receptorů P2Y<sup>16, 25</sup>.

#### 1.3.2.1 Receptory P2Y

Pro metabotropní receptory P2Y jsou charakteristické tyto vlastnosti: extracelulární N-konec a intracelulární C-konec; sedm transmembránových domén, vysoká hladina homologních sekvencí mezi transmembránovými doménami; strukturní rozmanitost intracelulárních smyček a C-konců u různých podtypů receptorů P2Y, která má vliv na stupeň spřažení s proteiny  $G_{q/11}$ ,  $G_s$  a  $G_i$ . Každý receptor P2Y se váže s jedním heterotrimerním G-proteinem, typicky  $G_{q/11}$ . Avšak P2Y<sub>11</sub> může být spřažen s dvěma typy G-proteinů –  $G_{q/11}$  a  $G_s$ , zatímco P2Y<sub>13</sub> je spřažen s  $G_i$ . Receptory P2Y mohou za určitých podmínek tvořit homo- a heteromerní sestavy. Geny těchto receptorů ve své kódující oblasti neobsahují introny<sup>23</sup>. Některé receptory P2Y jsou aktivovány především pomocí nukleotiddifosfátů (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>), zatímco jiné jsou aktivovány hlavně pomocí nukleotidtrifosfátů (P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>). Některé receptory P2Y jsou aktivovány jak purinovými, tak i pyrimidinovými nukleotidy (P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>), jiné jenom pomocí purinových nukleotidů (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>). Receptory P2Y reagují na aktivaci nukleotidem buď aktivací PLC a uvolněním intracelulárních iontů  $Ca^{2+}$  (prostřednictvím tvorby IP<sub>3</sub> a DAG), nebo působí na adenylátcyklázu a pozměňují hladinu cAMP<sup>16</sup>.

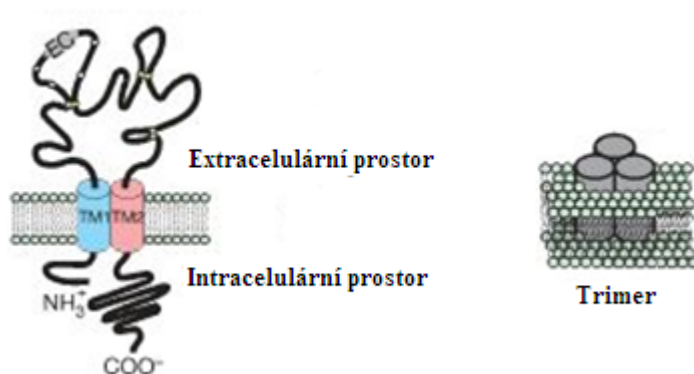
U obratlovců je známo 8 podtypů receptorů P2Y (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> a P2Y<sub>14</sub>)<sup>26</sup>, které se v organismu podílí na mnoha funkcích – vyskytují se v endoteliálních buňkách, v hepatocytech, v pankreatických  $\beta$ -buňkách jsou zapojeny do sekrece insulinu, dále se podílejí na myelinizaci Schwannových buněk nebo jsou také přítomny v různých oblastech ledvin - glomeruly, tubuly a sběrné kanálky. Receptory P2Y jsou také zapojeny do signalizace endokrinních buněk a do sekrece hormonů. Mají silné zastoupení i v mozku, v presynaptických místech a v buňkách glií<sup>27</sup>.

### 1.3.2.2 Receptory P2X a jejich molekulární struktura

Receptory P2X (Obr. 3) jsou membránové iontové kanály aktivované ligandem, které se otevírají po navázání extracelulárního ATP. Hrají důležitou roli v kontrole buněčných funkcí, jako jsou neurotransmise, sekrece hormonů, regulace transkripce a proteosyntéza<sup>28</sup>.

Klonováním genů kódujících receptory P2X se zjistilo, že patří do nové rodiny savčích ionotropních receptorů. Receptory P2X jsou homomerní nebo heteromerní proteiny tvořící skupinu sedmi podjednotek P2X<sub>1</sub> - P2X<sub>7</sub>, které jsou ve své aminokyselinové sekvenci z 30 – 50 % identické. Celý protein má délku v rozmezí od 379 (P2X<sub>6</sub>) do 595 (P2X<sub>7</sub>) aminokyselin<sup>25, 29, 30, 31</sup>.

Každá podjednotka má dvě hydrofobní transmembránové domény (TM1 a TM2) navzájem oddělené extracelulární smyčkou - ektodoménou. Ektodoména obsahuje deset konzervovaných zbytků cysteinu, které mohou tvořit disulfidické vazby a přispívat k tvorbě terciární struktury receptoru<sup>32</sup>. NH<sub>2</sub> a COOH konce jsou lokalizovány tak, že směřují do cytoplasmy (Obr. 3)<sup>25, 30, 31</sup>.



**Obrázek č. 3: Receptory P2X** – schématické znázornění molekulární struktury; vlevo: EC- extracelulární doména; TM1, TM2- transmembránové domény 1 a 2; vpravo: znázornění trimerního receptoru P2X (převzato z Khakh et al. 2006<sup>29</sup>)

Hydrofobní oblasti receptorů (TM1 a TM2) jsou dostatečně dlouhé na překřížení plasmatické membrány; první transmembránová doména kříží membránu u zbytků 30 až 50 a druhá 330 až 353. Obě TM1 i TM2 přispívají k tvorbě póru<sup>31</sup>. Extracelulární smyčka se nachází v pozicích aminokyselin od 50 do 330 a obsahuje ATP-vazebné místo<sup>33</sup> a místa pro antagonisty a modulátory<sup>28, 30</sup>. Extracelulární smyčka je na dvou až šesti místech glykosylovaná, přičemž k tomu, aby se receptor dostal na povrch buňky, jsou potřebná alespoň dvě glykosylovaná místa<sup>30</sup>.

Od N-konce přes druhou transmembránovou doménu podjednotky dosahují relativně vysoké homologie aminokyselinové sekvence. Naproti tomu, C-konce se liší v délce a zdánlivě nevykazují žádnou sekvenční homologii, až na oblast v blízkosti druhé transmembránové domény<sup>28, 31</sup>.

Funkční receptory P2X jsou složeny ze tří podjednotek (Obr. 3, s. 17), které mohou být stejné (homomerní receptory) nebo různé (heteromerní receptory). Shlukování receptorů P2X do trimerů je s největší pravděpodobností podmínkou funkčnosti kanálů<sup>28</sup>. Heteromerizace receptorů (zjištěna na základě koimunoprecipitace; Tab. 3) může být následovná: podjednotky P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub> a P2X<sub>3</sub> se spolu spojují ve všech kombinacích; P2X<sub>5</sub> a P2X<sub>6</sub> se často spájejí s P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub> a P2X<sub>4</sub>; zatímco P2X<sub>7</sub> tvoří jenom homomerní kanály<sup>28, 31</sup>.

**Tabulka č. 3: Potenciální heteromerizace podjednotek receptorů P2X** – podjednotky receptorů P2X obsahují jednu ze dvou značených podjednotek; pokusy byly prováděny v párech na buňkách HEK293 (převzato z North 2002<sup>31</sup>)

	P2X <sub>1</sub>	P2X <sub>2</sub>	P2X <sub>3</sub>	P2X <sub>4</sub>	P2X <sub>5</sub>	P2X <sub>6</sub>	P2X <sub>7</sub>
P2X <sub>1</sub>	+	+	+	–	+	+	–
P2X <sub>2</sub>		+	+	–	+	+	–
P2X <sub>3</sub>			+	–	+	–	–
P2X <sub>4</sub>				+	+	+	–
P2X <sub>5</sub>					+	+	–
P2X <sub>6</sub>						–	–
P2X <sub>7</sub>							+

Zjištění, že k aktivaci receptoru jsou potřebné dvě až tři molekuly ATP je v souladu s hypotézou, že každá podjednotka P2X má jednu ATP-vazebnou doménu<sup>34</sup>. Navázání ATP vede ke konformačním změnám v celém proteinu a k přechodům mezi otevřeným, uzavřeným a desensitizovaným stavem iontového kanálu a k průchodu iontů<sup>28</sup>. Vyřešením krystalové struktury receptorů P2X s navázaným ATP se zjistilo, že negativně nabitě

zbytky aminokyselin v ATP-vazební doméně koordinují komplex  $\text{ATP-Mg}^{2+}$ , pozitivně nabitě zbytky vážou fosfátový řetězec ATP a aromatické zbytky vážou adeninový kruh  $\text{ATP}^{28}$ . Receptory  $\text{P2X}$  se od sebe odlišují v jejich citlivosti na ATP, která je v pořadí:  $\text{P2X}_1 = \text{P2X}_3 > \text{P2X}_2 > \text{P2X}_4 = \text{P2X}_5 > \text{P2X}_6 \gg \text{P2X}_7$ .

Všechny receptory  $\text{P2X}$  jsou permeabilní pro malé monovalentní kationty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), některé mají výraznou permeabilitu pro ionty vápníku a anionty. Aktivace receptorů  $\text{P2X}_2$ ,  $\text{P2X}_4$  a monomérních  $\text{P2X}_7$  zvyšuje permeabilitu i pro velké organické kationty (jako je N-methyl-D-glutamin - NMDG, trisaminomethan - Tris a triethanolamin -TEA) a některá fluorescenční barviva<sup>31</sup>.

Otevírání kanálů má dvě fáze. První nastupuje několik milisekund od aplikace agonisty, při ní je kanál stabilní. Ke druhé dochází prodlouženým působením agonisty (stovky milisekund), kanál se ještě více rozšíří a dojde k další změně konformace (= dilatace kanálu), která umožní průnik velkých organických iontů. Nakonec dojde k destabilizaci kanálu. Nejvíce propouští velké organické ionty  $\text{P2X}_7$ , méně  $\text{P2X}_4$  a  $\text{P2X}_2$ , nejméně, nebo vůbec  $\text{P2X}_1$  a  $\text{P2X}_3$ <sup>30, 31</sup>. Motiv podílející se na dilataci póru iontového kanálu a tedy na propouštění velkých organických iontů se nachází na C-konci proteinu<sup>30</sup>.

Jednotlivé receptory  $\text{P2X}$  se od sebe odlišují především podle svých vlastností, jakými jsou rychlost desensitizace, propustnost pro vápenaté ionty, propustnost pro velké organické ionty nebo podle jejich různé citlivosti k agonistům a antagonistům.

## **1.4 Purinergní signalizace a její funkce v dospělé hypofýze**

### **1.4.1 Extracelulární ATP a hypofýza**

Buňky hypofýzy sekretují ATP, které slouží jako autokrinní a/nebo parakrinní extracelulární messenger pro dvě rodiny purinergních receptorů,  $\text{P2X}$  a  $\text{P2Y}$ <sup>35, 36</sup>.

ATP v neuroendokrinním systému působí parakrinním způsobem. Vyvolává zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  v hypothalamických neuronech<sup>36, 37</sup> a stimuluje také tvorbu  $\text{IP}_3$  v heterogenních populacích ovčích hypofyzárních buněk<sup>36, 38</sup>. Chen a jeho spolupracovníci<sup>36, 39</sup> zpracovali tyto výsledky použitím „real-time imaging Fura-2 fluorescence“ na úrovni jedné buňky a ukázali, že ATP rychle zvyšuje  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  přibližně ve 30 % buněk přední hypofýzy dospělých potkanů. Navíc, jako jedny z cílových buněk pro ATP identifikovali gonadotropní buňky a také ukázali, že i membránové receptory  $\text{P2Y}$  spřažené s G-proteinem zprostředkovávají intracelulární  $\text{Ca}^{2+}$ -odpovědi. Fyziologická důležitost tohoto pozorování byla zdůrazněna

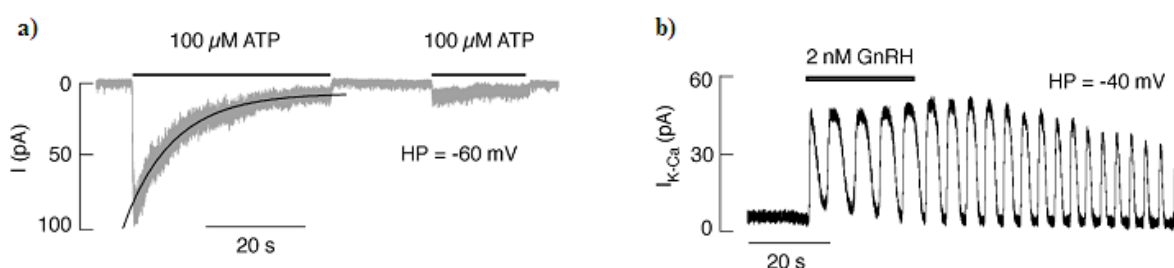
následným objevem, že ATP (a UTP) prostřednictvím těchto receptorů může stimulovat uvolnění LH z perfundovaných buněk hypofýzy<sup>27</sup>.

Pokusy s buňkami  $\alpha$ T3-1 odvozenými od gonadotropů ukázaly, že extracelulární ATP způsobuje dvoufázové zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$ , které není doprovázené žádnou zjevnou změnou v hladině cAMP nebo cGMP. Tyto studie poskytly také první důkaz pro translokaci PKC pomocí ATP-receptorů<sup>36, 40</sup>. U dospělých potkanů ATP zvyšuje  $[Ca^{2+}]_i$  ve všech typech buněk přední hypofýzy, tedy v laktotropech, somatotropech, kortikotropech, tyreotropech i gonadotropech<sup>36</sup>. ATP může také iniciovat mezibuněčné  $Ca^{2+}$ -vlny.

Endogenní koncentrace extracelulárního ATP jsou v rozsahu 100-200  $\mu$ M, což je více než dostačující k aktivaci všech typů receptorů P2X<sup>41</sup>.

*In vivo* může být účinek ATP kontrolován ektonukleotidázami typu E-NTPDáza 1-3, které jsou přítomné v buňkách hypofýzy i hypotalamu<sup>42</sup>. Ekto-5'-nukleotidáza, která vytváří adenosin z AMP, se vyskytuje přibližně ve 20 % buněk přední hypofýzy. Tyto enzymy jsou významným pomocníkem při kontrole trvání účinku extracelulárního ATP<sup>43</sup>.

Pomocí jednobuněčných analýz „patch-clamp“ na gonadotropech dospělých potkanů se zjistilo, že aplikace ATP vytváří depolarizující neoscilující proud ve všech gonadotropech, na rozdíl od působení GnRH, který spouští oscilující hyperpolarizující proud (Obr. 4). Z toho vyplývá, že v tomto konkrétním typu buněk pravděpodobně nejsou přítomné receptory P2Y mobilizující ionty  $Ca^{2+}$ .

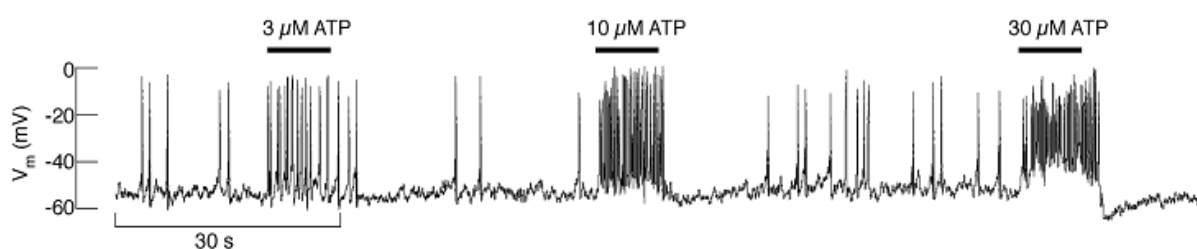


**Obrázek č. 4: Identifikace receptoru P2X<sub>2</sub> v potkaních gonadotropech elektrofyziologickou metodou „patch clamp“** a) aplikace ATP vytváří ve všech dospělých gonadotropech depolarizující neoscilující proud; b) aplikace GnRH spouští oscilující hyperpolarizující proud;  $I_{K-Ca}$  „vápníkem aktivovaný draslíkový proud“; HP- „holding potential“, při kterém bylo měření provedeno (převzato z Stojilkovic et al. 2010<sup>20</sup>; Zemkova et al. 2008<sup>41</sup>)

Biofyzikální a farmakologické vlastnosti depolarizujícího proudu stimulovaného extracelulárním ATP (kinetika aktivace, deaktivace, desensitizace a resensitizace) v gonadotropech dospělých potkanů byly srovnatelné s těmi, které byly pozorovány v buňkách obsahujících rekombinantní receptory P2X<sub>2</sub>. Tento závěr potvrzuje také citlivost



ATP-stimulovaného proudu na inhibici pyridoxal-5'-fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonátem (PPADS), reaktivním „blue 2“ a suraminem, ale i nedostatečný účinek ivermektinu, specifického alosterického modulátoru receptoru P2X<sub>4</sub>. ATP-stimulovaná rychlá depolarizace gonadotropů vede k iniciaci elektrické aktivity v klidových buňkách, ve spontánně aktivních buňkách zvyšuje frekvenci akčního potenciálu (Obr. 5) a nakonec dochází k přechodnému uvolnění LH. ATP ovlivňuje také GnRH-stimulované oscilace, které závisí na obsahu iontů Ca<sup>2+</sup> v intracelulárních zásobách. Tyto výsledky ukazují, že receptory P2X<sub>2</sub> mohou v gonadotropech dospělé hypofýzy působit jako „pacemaking“ kanály a modulátory elektrické aktivity a sekrece kontrolované GnRH<sup>20, 44</sup>.



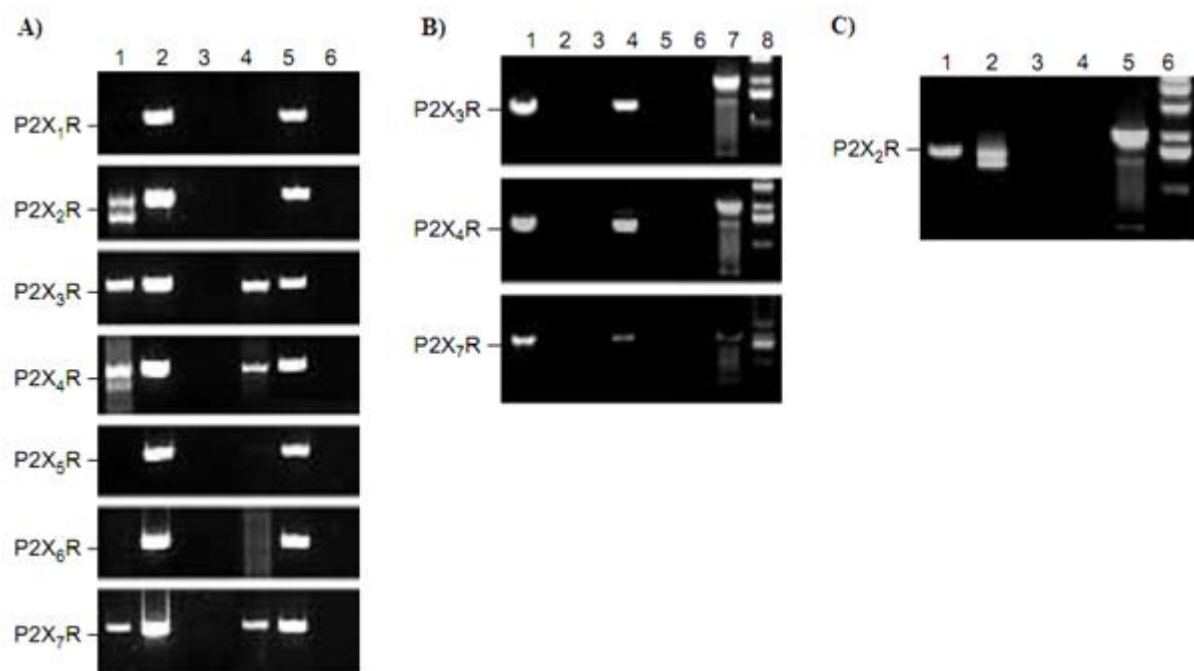
**Obrázek č. 5:** Vliv ATP na frekvenci akčního potenciálu, závislý na koncentraci, na úroveň následné hyperpolarizace ve spontánně aktivní buňce (převzato z Stojilkovic et al. 2010<sup>20</sup>; Zemkova et al. 2006<sup>44</sup>)

Dále bylo zjištěno, že v dospělé hypofýze přibližně 90 % identifikovaných TRH-citlivých buněk, konkrétně laktotropů, odpovídá na aplikaci ATP vznikem depolarizujících proudů a zvýšením frekvence akčních potenciálů. I když při supramaximální koncentraci ATP byl v gonadotropech průměr amplitudy proudu několikanásobně vyšší než v laktotropech, jejich proudové profily byly srovnatelné. Specifický alosterický modulátor receptoru P2X<sub>4</sub>, ivermektin, zvyšoval ATP-vyvolané proudy jenom v laktotropech. V přítomnosti ivermektinu byl viditelný přibližně 6ti-násobní vzrůst maximální amplitudy proudu. Ivermektin také výrazně zvyšoval citlivost receptorů, zpožďoval deaktivaci a zvyšoval ATP-stimulované uvolnění PRL. Tyto výsledky ukázaly, že laktotropy pravděpodobně obsahují homomerní a/nebo heteromerní receptory P2X<sub>4</sub>, které působí jako „pacemaking“ kanály<sup>20, 45</sup>.

#### 1.4.2 Exprese transkriptů receptorů P2X v buňkách předního laloku hypofýzy

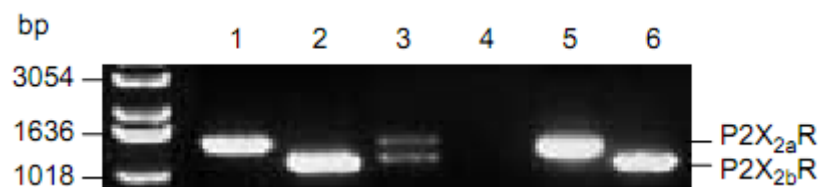
Molekulární identifikace receptorů P2X exprimovaných v buňkách přední hypofýzy byla objasněna pomocí RT-PCR („real-time“ polymerázová řetězová reakce) za použití neonatálních<sup>44</sup> i dospělých<sup>46</sup> potkaních buněk. Pomocí specifických primerů receptorů P2X byly detekovány transkripty kódující receptory P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub> ve smíšených

populacích buněk přední hypofýzy (Obr. 6A). Imortalizované buňky GH<sub>3</sub> citlivé na TRH také exprimovaly transkripty pro receptory P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub>, ale ne pro P2X<sub>2</sub> (Obr. 6A). Výskyt receptorů P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub> byl identifikován v laktotropech, ale ne v somatotropech (Obr. 6B). Naopak receptory P2X<sub>2</sub> byly identifikované v somatotropech, ale ne v laktotropech (Obr. 6C). Transkripty pro receptory P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>5</sub> a P2X<sub>6</sub> nebyly přítomné ve směsi hypofyzárních buněk ani v buňkách GH<sub>3</sub> (Obr. 6A)<sup>35</sup>.



**Obrázek č. 6: Exprese receptorů P2X v buňkách přední hypofýzy.** A) Detekce receptorů P2X v smíšené populaci buněk přední hypofýzy (sloupec 1) a imortalizovaných buňkách GH<sub>3</sub> (sloupec 4); jako pozitivní kontroly byly použity plasmidy obsahující cDNA kódující receptory P2X (sloupec 2 a 5); pro negativní kontrolu bylo provedeno PCR na vzorcích jednovláknové cDNA bez RT (sloupec 3 a 6). B) Exprese mRNA kódující receptory P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub> v obohacených somatotropech (sloupec 2) a laktotropech (sloupec 4); jako pozitivní kontrola byly použity plasmidy obsahující cDNA kódující receptory P2X (sloupec 1); pro negativní kontrolu bylo provedeno PCR na vzorcích jednovláknové cDNA bez RT (sloupec 3 a 5); pro netemplátovou kontrolu byla použita voda (sloupec 6); marker velikosti je ukázán v sloupcích 7 a 8. C) Exprese mRNA kódující receptory P2X<sub>2</sub> v obohacených somatotropech (sloupec 2) a laktotropech (sloupec 4); jako pozitivní kontrola byly použity plasmidy obsahující cDNA kódující receptory P2X (sloupec 1); pro negativní kontrolu bylo provedeno PCR na vzorcích jednovláknové cDNA bez RT (sloupec 3); marker velikosti je ukázán v sloupcích 5 a 6 (převzato z Stojilkovic et al. 2001<sup>35</sup>)

Současně bylo ve směsi hypofyzárních buněk pomocí primerů P2X<sub>2</sub> amplifikováno velké množství produktů PCR dvou odlišných velikostí, přibližně 1,6 a 1,4 kb, naznačující dvě odlišně dlouhé transkripty pro receptory P2X<sub>2</sub> se stejným profilem primerů (Obr. 7). Mapování restrikčními endonukleázami a analýza nukleotidové sekvence těchto fragmentů ukázaly expresi standardního („wild-type“) kanálu označeného jako P2X<sub>2a</sub> a kanálu s nižší molekulární hmotností, označeného jako P2X<sub>2b</sub><sup>35</sup>.



**Obrázek č. 7: Expres podjednotek P2X<sub>2</sub> v buňkách přední hypofýzy;** RT-PCR-analýza celkové RNA z primární kultury směsi buněk přední hypofýzy (sloupec 3) a z neuronů GT1 expresujících receptory P2X<sub>2a</sub> (sloupec 1), receptory P2X<sub>2b</sub> (sloupec 2) a bez exprese (sloupec 4); pozitivní kontrola PCR pro P2X<sub>2a</sub> (sloupec 5) a P2X<sub>2b</sub> (sloupec 6) (převzato z Stojilkovic et al. 2001<sup>35</sup>)

Další studie ukázala, že myší hypofýza exprimuje dokonce tři formy podjednotek P2X<sub>2</sub>: P2X<sub>2a</sub> s celkovou délkou a štěpné formy P2X<sub>2b</sub> a P2X<sub>2e</sub>, kterým chybí na C-konci 69 (pro P2X<sub>2b</sub>) a 90 (pro P2X<sub>2e</sub>) aminokyselinových zbytků. Tyto delece na C-konci účinně snižují amplitudu a trvání vápníkových signálů<sup>47</sup>. Všechny tři myší formy měly navíc přidaných 13 N-terminálních zbytků, které nebyly přítomné v hypofýze potkanů. Elektrofyzilogické experimenty odhalily, že rychlost desensitizace receptoru P2X<sub>2e</sub> byla srovnatelná s velkými rychlostmi desensitizace receptorů P2X<sub>1</sub> a P2X<sub>3</sub>. Rychlost desensitizace P2X<sub>2b</sub> byla rychlejší než P2X<sub>2a</sub>, ale pomalejší než P2X<sub>2e</sub>.

Expres štěpených forem receptoru P2X<sub>2</sub> není unikátní jenom pro hypofýzu – byly také zjištěny v potkaním mozku, ledvinách, slezině nebo ve střevech. Ve všech těchto tkáních analýza nukleotidové sekvence odhalila, že receptoru P2X<sub>2b</sub> chybějí C-terminální aminokyseliny (Val<sup>370</sup>-Gln<sup>438</sup>)<sup>35</sup>.

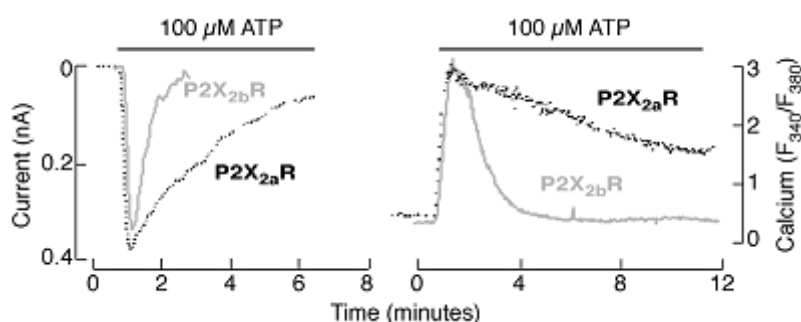
Fyziologická důležitost těchto štěpných forem je v tvorbě funkčních heteromerů, které desensitizují rychleji než receptory s celkovou velikostí, ale pomaleji než homomerní štěpné formy receptorů. Tato vlastnost zamezuje nadměrnému vstupu iontů. Také způsobuje, že se během prodloužené aplikace agonistů signalizace neukončuje. Takovéto heteromery se vyskytují v gonadotropech a somatotropech hypofýzy, avšak v dalších buněčných typech hypofýzy nebyly identifikovány<sup>35, 43</sup>.

#### 1.4.3 Identifikace funkčních receptorů P2X v buňkách hypofýzy dospělého potkana

Stojilkovic a spol. (2001)<sup>35</sup> studovali za použití rekombinantních receptorů P2X jejich schopnost depolarizovat buněčnou membránu a iniciovat Ca<sup>2+</sup>-signalizaci. K tomu použili rekombinantní receptory P2X exprimované v imortalizovaných neuronech GT1-7 sekretujících GnRH (známých jako buňky GT1). Buňky GT1 jsou, podobně jako buňky přední hypofýzy a mnohé další neuroendokrinní a endokrinní buňky, vystaveny řízenému vstupu iontů Ca<sup>2+</sup> přes Ca<sup>2+</sup>-kanály aktivované napětím. Kromě toho pro buňky GT1

nejsou receptory P2X ani  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizující receptory P2Y přirozené. Proto tyto buňky patří mezi nejvhodnější savčí modelové systémy pro analýzu  $\text{Ca}^{2+}$ -signalizace receptorů P2X a pro studium jejich závislosti na napětí citlivém vstupu iontů  $\text{Ca}^{2+}$ .

Pro studium rychlosti desenzitizace byly receptory P2X stimulovány pomocí ATP. Receptory P2X<sub>7</sub>, které mají nízkou citlivost k ATP, byly stimulovány účinným analogem ATP, agonistem BzATP. Bylo zjištěno, že aktivace kanálů je rychlá v buňkách exprimujících P2X<sub>2a</sub> a P2X<sub>2b</sub>, ale během přetrvávající stimulace ATP desenzitizuje P2X<sub>2b</sub> rychle a úplně, zatímco P2X<sub>2a</sub> desenzitizuje pomaly a neúplně (Obr. 8):



**Obrázek č. 8: Zkrácení C-terminálního konce přispívá k desenzitizaci receptorů P2X<sub>2</sub>.** Vlevo je znázorněn typický průběh ATP-stimulovaného proudu a vpravo „vápníková signalizace“ receptoru s plnou délkou (P2X<sub>2a</sub>) a štěpné formy (P2X<sub>2b</sub>) s kratším C-koncem (převzato z Stojilkovic et al. 2005<sup>28</sup>)

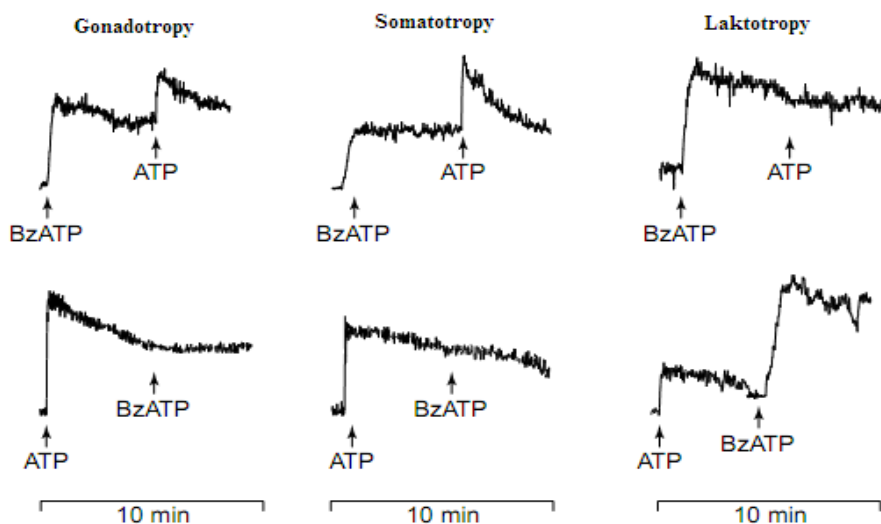
P2X<sub>3</sub> desenzitizuje rychleji než P2X<sub>4</sub>, naopak v P2X<sub>7</sub>-exprimujících buňkách, stimulovaných alespoň 10 minut 100  $\mu\text{M}$  BzATP, nebyla pozorována žádná desenzitizace.

Následující pořadí odráží v souhrnu rychlost desenzitizace receptorů P2X: P2X<sub>1</sub> > P2X<sub>3</sub> > P2X<sub>2b</sub> = P2X<sub>4</sub> > P2X<sub>2a</sub> > P2X<sub>7</sub>. Receptor P2X<sub>5</sub> je málo funkční a P2X<sub>6</sub> je nefunkční. Rychlost desenzitizace není závislá na stupni exprese receptorů. Amplituda proudu a  $\text{Ca}^{2+}$ -odpověď však na ni závislé jsou. Nejvyšší amplitudu proudu a  $\text{Ca}^{2+}$ -odpovědi vytváří buňky exprimující P2X<sub>7</sub>, následované buňkami exprimujícími receptory P2X<sub>2a</sub>, P2X<sub>2b</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>3</sub><sup>35, 43, 48</sup>.

Kromě rozdílů v amplitudě proudu,  $\text{Ca}^{2+}$ -odpovědi a v rychlosti receptorové desenzitizace se rekombinantní receptory P2X liší také v jejich citlivosti k agonistům. Například receptory P2X<sub>3</sub> jsou citlivé k  $\alpha\beta\text{meATP}$  ( $\alpha\beta$ -methylen ATP), zatímco receptory P2X<sub>2a</sub>, P2X<sub>2b</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub> nejsou. Homomerní receptory P2X<sub>2a</sub>, P2X<sub>2b</sub> a P2X<sub>7</sub> jsou citlivé na antagonistu receptorů P2X, suramin, zatímco P2X<sub>4</sub> není. Receptory P2X<sub>7</sub> jsou vysoce citlivé k BzATP a málo citlivé k ATP, zatímco P2X<sub>2a</sub> a P2X<sub>2b</sub> jsou citlivější k ATP než k BzATP<sup>31</sup>. Všechny tyto specifické vlastnosti Stojilkovic a spol. (2001)<sup>35</sup> využili

k hledání specifické exprese receptorů P2X v buňkách přední hypofýzy u dospělých potkanů.

$\alpha\beta\text{meATP}$  vyvolal v 50 % laktotropů vzrůst  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  podobný tomu, jaký byl pozorován v buňkách exprimujících rekombinantní receptory P2X<sub>3</sub>. ATP vyvolal přibližně u 33 % laktotropů  $\text{Ca}^{2+}$ -odpověď necitlivou na suramin, a to podobným způsobem jaký byl pozorován v buňkách exprimujících rekombinantní receptory P2X<sub>4</sub>. BzATP, agonista, který aktivuje receptory P2X<sub>7</sub> a P2X<sub>2</sub>, vyvolal vzrůst  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  v laktotropech, somatotropech a gonadotropech. Přibližně 75 % laktotropů reagovalo na BzATP s nedesenzitizující  $\text{Ca}^{2+}$ -odpovědí, která je typická pro buňky exprimující P2X<sub>7</sub> a přidání ATP do přítomného BzATP nemělo žádný účinek (Obr. 9). Naopak v gonadotropech a somatotropech přidání ATP k přítomnému BzATP zvýšilo  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (obr. 9), což naznačuje, že tyto buňky exprimují podjednotky receptorů P2X<sub>2</sub>.



**Obrázek č. 9: Farmakologická charakterizace receptorů P2X v buňkách přední hypofýzy.** Typické záznamy  $\text{Ca}^{2+}$ -signálů v gonadotropech, somatotropech a laktotropech stimulovaných pomocí ATP a jeho analogu BzATP (převzato z Stojilkovic et al. 2001<sup>35</sup>)

Tyto výsledky, shrnuté v tabulce č. 4, jsou v souladu s analýzou RT-PCR (Obr. 6, s. 22) a potvrzují, že laktotropy exprimují receptory P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub>, gonadotropy a somatotropy exprimují výlučně receptory P2X<sub>2</sub>.

**Tabulka č. 4: Distribuce funkčních receptorů P2X v buňkách hypofýzy** (čísla udávají procento ze zkoumaných buněk hypofýzy). Analýza byla provedena „ $\text{Ca}^{2+}$ -imagingem“.

Buněčný typ	P2X <sub>2</sub>	P2X <sub>3</sub>	P2X <sub>4</sub>	P2X <sub>7</sub>
Gonadotropy	84	0	0	0
Somatotropy	82	0	0	0
Laktotropy	0	50	33	74

V laktotropech byla často pozorována také koexprese receptorů P2X. Frakce buněk exprimující receptory P2X<sub>3</sub> sensitivní k  $\alpha\beta$ meATP reagovala na aplikaci BzATP a ATP dalším zvýšením  $[Ca^{2+}]_i$ , a to pravděpodobně prostřednictvím aktivace receptorů P2X<sub>7</sub>. Přibližně 15 % laktotropů reagovalo na BzATP s nedesensitizující reakcí a na ATP s klesající odpovědí, což značí expresi jak receptorů P2X<sub>7</sub>, tak i P2X<sub>2</sub> ve stejných buňkách<sup>35, 46</sup>.

#### 1.4.4 Receptory P2X a vstup iontů $Ca^{2+}$ citlivý a necitlivý k napětí

Aktivace receptorů P2X v excitabilních buňkách vytváří  $Ca^{2+}$ -signály dvěma mechanismy: buď přímo vedením iontů  $Ca^{2+}$  kanálem receptoru P2X nebo nepřímo, depolarizací buněk a aktivací vstupu iontů  $Ca^{2+}$  citlivému k napětí. Do jaké míry se vstup iontů  $Ca^{2+}$  citlivý na napětí účastní vytváření  $Ca^{2+}$ -signálů pomocí receptorů P2X bylo prozkoumáno jak v buňkách hypofýzy, tak i v neuronech GT1 exprimujících rekombinantní receptory P2X<sub>2a</sub>, P2X<sub>2b</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub>. Tyto experimenty naznačily, že ve všech excitabilních buňkách exprimujících receptory P2X je  $Ca^{2+}$ -signalizace do jisté míry závislá jak na vstupu iontů  $Ca^{2+}$  citlivému k napětí, tak i na vstupu iontů  $Ca^{2+}$  necitlivému k napětí<sup>29, 35, 46</sup>.

Rekombinantní receptory P2X<sub>3</sub> a P2X<sub>4</sub> mají  $Ca^{2+}$ -signalizaci převážně závislou na vstupu iontů  $Ca^{2+}$  citlivém na napětí, zatímco oba typy vstupů iontů  $Ca^{2+}$  přispívají stejným dílem k  $Ca^{2+}$ -odpovědím v buňkách exprimujících receptory P2X<sub>2a</sub> a P2X<sub>2b</sub>. Aktivace receptorů P2X<sub>7</sub> závisí také na vstupu iontů  $Ca^{2+}$  citlivém na napětí, ale jenom přechodně a jenom když jsou buňky stimulovány nízkou koncentrací ATP. Prodloužená aplikace 100  $\mu$ M BzATP u neuronů GT1 exprimujících P2X<sub>7</sub> vede k dilataci póru iontového kanálu a permeabilizaci plasmatické membrány. Bylo zjištěno, že tento aktivační krok závisí na délce C-konce receptoru P2X<sub>7</sub> a na teplotě prostředí. Zvýšená permeabilita má za následek vstup velkých iontů a unikání malých metabolitů. To může způsobit rozpínání buněk a vakuolizaci a vést k buněčné smrti nekrosou a/nebo apoptosou<sup>35</sup>.

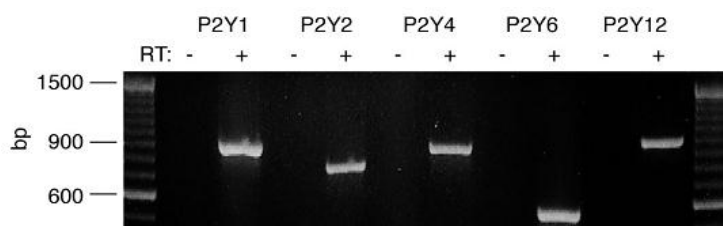
### 1.4.5 Receptory P2Y a adenosinové receptory v hypofýze

Buňky přední hypofýzy exprimují také receptory P2Y a několik adenosinových receptorů<sup>35, 36, 43</sup>. Přírodní receptory P2Y přítomné v buňkách hypofýzy jsou aktivovány pomocí ATP, ADP, UTP a UDP a jejich aktivace je také doprovázena stimulací PLC a tvorbou IP<sub>3</sub> a DAG, uvolněním iontů vápníku z intracelulárních zásob a translokací PKC<sup>27, 38, 40</sup>.

Molekulární klonování a funkční charakterizace receptorů P2Y v hypofýze potkanů odhalily expresi receptoru P2Y<sub>2</sub>. ATP a UTP jsou pro tento typ receptorů ekvivalentní agonisté. Podjednotky P2Y<sub>2</sub> jsou lokalizovány v laktotropech a imortalizovaných buňkách GH<sub>3</sub>, ale nejsou přítomny v somatotropech a gonadotropech<sup>20, 35, 46</sup>.

Ve folikulostelárních buňkách potkaní hypofýzy byla také identifikována přítomnost receptorů P2Y citlivých k UTP. Jejich exprese byla objevena v gonadotropech a laktotropech, ale v následných studiích tyto závěry nebyly potvrzené<sup>20, 43</sup>.

Analýzy směsi buněk přední hypofýzy pomocí RT-PCR odhalily kromě receptorů P2Y<sub>2</sub> také přítomnost transkriptů pro receptory P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> a P2Y<sub>12</sub> (Obr. 10)<sup>20</sup>.



**Obrázek č. 10: Detekce mRNA transkriptů receptorů P2Y v smíšené populaci buněk přední hypofýzy (převzato z Stojilkovic, 2010<sup>20</sup>)**

Buňky hypofýzy exprimují také adenosinové receptory A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> a A<sub>3</sub>. Funkční receptory A<sub>1</sub> byly identifikovány v laktotropech a imortalizovaných hypofyzárních buňkách. Receptory A<sub>2B</sub> byly exprimovány ve folikulostelárních buňkách, přičemž stimulují sekreci interleukinu-6 a tvorbu spojení „gap junction“. Receptory A<sub>3</sub> byly objeveny v buňkách hypofyzárního tumoru a mohou přispívat k antiproliferační funkci adenosinu<sup>43</sup>.

Expresi receptorů P2X, P2Y a A<sub>1</sub> ve stejném buněčném typu je v souladu se sekvenčním módem účinku ATP. V případě laktotropů endogenní ATP zpočátku stimuluje receptory P2X<sub>4</sub>, podporuje vstup iontů Ca<sup>2+</sup> přes póry kanálu, ale také depolarizací vyvolaný vstup iontů Ca<sup>2+</sup> přes kanály pro Ca<sup>2+</sup> řízené napětím. Hydrolýza ATP na ADP může vypnout aktivitu receptoru P2X<sub>4</sub> a současně zahájit aktivitu receptoru

P2Y<sub>1</sub>, což vede k aktivaci PLC, tvorbě DAG a IP<sub>3</sub> a uvolnění iontů Ca<sup>2+</sup> z endoplasmatického retikula. Na druhé straně přeměna ADP na AMP a adenosin poskytuje dráhu pro aktivaci receptoru A<sub>1</sub>, která svou elektrickou aktivitou přímo inhibuje Ca<sup>2+</sup>-kanály řízené napětím a nepřímo stimuluje K<sup>+</sup>-kanály řízené napětím pomocí dimeru βγ heteromerních proteinů G<sub>i/o</sub><sup>35, 43</sup>.

### 1.5 Specifické vlastnosti neonatálních gonadotropních buněk

Jak již bylo výše uvedeno, GnRH kontroluje uvolnění hormonů LH a FSH z hypofyzárních gonadotropů tím, že vyvolává zvýšení koncentrace intracelulárních iontů Ca<sup>2+</sup>. U dospělých gonadotropů je aktivace receptoru GnRH spřažena s G<sub>q/11</sub>-proteinem, který stimuluje PLC, což vede k hydrolýze membránových fosfoinositolů na IP<sub>3</sub> a DAG. Následně IP<sub>3</sub> zahajuje oscilující uvolnění iontů Ca<sup>2+</sup> z intracelulárních zásob vazbou na jeho specifický receptor v endoplasmatickém retikulu. DAG aktivuje na Ca<sup>2+</sup>-závislou PKC, která pravděpodobně reguluje vstup extracelulárních iontů Ca<sup>2+</sup> přes vápníkové kanály závislé na napětí. V neonatálních gonadotropech, které mají méně receptorů GnRH a menší kapacitu intracelulárních zdrojů Ca<sup>2+</sup>, zatímco GnRH-stimulovaná-intracelulární Ca<sup>2+</sup>-signalizace nebyla detailně prozkoumána. Je však pravděpodobné, že se liší od dospělých gonadotropů. Neonatální GnRH-stimulované oscilace jsou pomalejší a více závislé na vstupu extracelulárních iontů Ca<sup>2+</sup><sup>49</sup>.

Nezralé gonadotropy projevují také některé jiné specifické vlastnosti, například jsou větší a morfologicky víc heterogenní, jejich skladovací granule obsahují častěji jenom LH nebo jenom FSH, zatímco dospělé gonadotropy obvykle obsahují oba typy hormonů. Navíc GnRH-stimulované uvolnění LH, nebo také zvýšení koncentrace intracelulárních iontů Ca<sup>2+</sup> v subpopulaci neonatálních gonadotropů, je inhibováno hormonem epifyzy, melatoninem<sup>50</sup>. Předpokládá se, že melatonin snižuje GnRH-vyvolané zvýšení koncentrace intracelulárních iontů Ca<sup>2+</sup> a to inhibicí nejenom vstupu extracelulárních iontů Ca<sup>2+</sup>, ale také uvolnění iontů Ca<sup>2+</sup> z intracelulárních zásob. Intracelulární mechanismus účinku melatoninu však ještě není dobře prozkoumán<sup>51</sup>. Melatoninový receptor, spřažený s proteinem G<sub>i/o</sub>, v průběhu postnatálního vývoje z buněk hypofýzy postupně mizí. Přesto však zůstává i v dospělosti, ale jeho koncentrace je jenom jedna desetina z neonatální hodnoty<sup>49</sup>.

Dále bylo zjištěno, že existují dvě odlišné dráhy pro zahájení GnRH-vyvolané vápníkové signalizace v neonatálních gonadotropech. První dráha je zprostředkována



tvorbou  $\text{IP}_3$ , zatímco druhá zahrnuje uvolnění iontů  $\text{Ca}^{2+}$  z ryanodin-sensitivních zásob, které mohou koaktivovat uvolnění iontů  $\text{Ca}^{2+}$  z  $\text{IP}_3$ -sensitivních zásob. Jenom tento druhý mechanismus je přístupný melatoninové inhibici<sup>49</sup>.

Purinergní signalizace nebyla v neonatální hypofýze dosud detailně studována. Není známé přesné zastoupení jednotlivých podtypů purinergních receptorů, ani jejich výskyt v jednotlivých podtypech sekrečních hypofyzárních buněk.

## 1.6 Měření koncentrace intracelulárních iontů vápníku

Měření koncentrace intracelulárních iontů vápníku je důležitou metodou výzkumu hypofyzárních buněk, protože ionty  $\text{Ca}^{2+}$  hrají významnou roli v signálních dráhách hypotalamických hormonů a parakrinních modulátorů jakým je i extracelulární ATP. Intracelulární koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$  je v živé buňce udržována řadou mechanismů na velmi nízké hladině ( $10^{-7} - 10^{-9}$  M). Ve většině buněk se při vápníkové signalizaci zvyšuje koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu, odkud difundují do jádra buňky, nebo jsou odčerpávány do mitochondriální matrix<sup>52</sup>.

Stálá koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$  je v buňce udržována iontovými kanály propustnými pro ionty vápníku a  $\text{Ca}^{2+}$ -transportujícími ATPázami, avšak mechanismy, kterými se řídí změny koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$  nejsou zcela pochopeny. Molekulami reagujícími na změny v koncentraci iontů  $\text{Ca}^{2+}$  jsou nejčastěji nejrozumnější proteinkinázy, které následně vyvolávají pomocí fosforylace cytoplazmatických a transmembránových proteinů nebo transkripčních faktorů změnu fyziologického stavu buňky.

Ke studiu mechanismů vedoucích ke změně koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$  je možno využít mikrofluorimetrických metod, kterými lze sledovat změny v koncentraci iontů  $\text{Ca}^{2+}$  buď přímo v živých buňkách (*in vivo*) nebo v izolovaných buňkách, které bývají součástí tkání (*in vitro*). Hlavními požadavky na měření a studium koncentrace intracelulárních iontů vápníku pomocí těchto metod jsou: minimální invazivnost a možnost sledovat změny koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$  v jednotlivých buněčných kompartmentech, a tak určit jejich vzájemné vztahy.

Pro stanovení vnitrobuněčné koncentrace iontů v živých buňkách se v posledních dvaceti letech staly velmi oblíbenými fluorescenční sondy. V současnosti je k dispozici více než 100 různých fluorescenčních indikátorů pro ionty  $\text{Ca}^{2+}$ , excitovaných UV nebo viditelným světlem založených převážně na struktuře kyseliny 1,2-bis-(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctové (BAPTA)<sup>14,52</sup> (Tab. 5)<sup>53</sup>

**Tabulka č. 5: Různé typy fluorescenčních indikátorů  $\text{Ca}^{2+}$  a jejich vlastnosti.**  $\lambda_F$  – vlnová délka pro volnou formu sondy,  $\lambda_B$  – vlnová délka pro vázanou formu sondy; Ex – značí měření při uvedené vlnové délce excitace, Em – značí měření při uvedené vlnové délce emise, dvojice čísel oddělená lomítkem značí poměrné měření při dvou různých vlnových délkách (převzato z Fišar, 2003<sup>53</sup>)

indikátor $\text{Ca}^{2+}$	excitace $\lambda_F(\lambda_B)$ (nm)	emise $\lambda_F(\lambda_B)$ (nm)	způsob měření	disociační konstanta (nmol/l)
Fura-2	362(335)	518(510)	Ex 340/380	145
Fura-5F			Ex 340/380	400
Fura-6F			Ex 340/380	5300
Fura-FF			Ex 340/380	5500
Indo-1	349(331)	482(398)	Em 405/485	230
Indo-5F			Em 405/485	470
Fluo-3	504	526	Em 525	390
Fluo-4			Em 520	345
Fluo-5F			Em 520	2300
Fluo-5N			Em 520	90000
Quin-2	356(336)	500(503)	Em 495	60
Rhod-2	550	581	Em 580	570
Rhod-FF			Em 580	19000
Rhod-5N			Em 580	320000
Oregon Green BAPTA-1	494	523	Em 520	170
Oregon Green BAPTA-2	494	523	Em 520	580
Oregon Green BAPTA-6F			Em 520	3000
Oregon Green BAPTA-5N	494	521	Em 520	20000
Calcium Green-1	506	534	Em 530	190
Calcium Green-2	506	536	Em 535	550
Calcium Green-5N	506	536	Em 530	14000

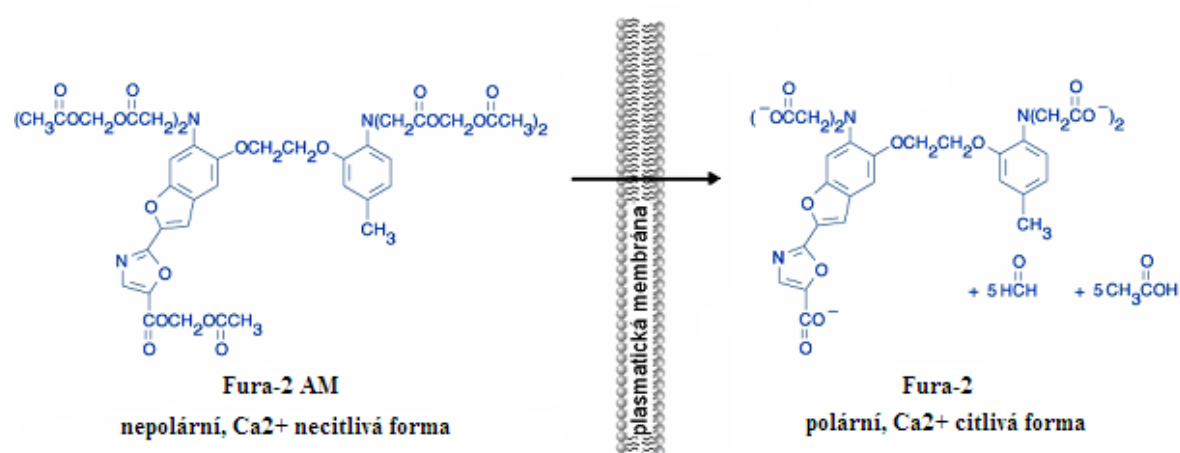
Fluorescenční indikátory dělíme na poměrové a nepoměrové. Poměrové mění po navázání iontů  $\text{Ca}^{2+}$  polohu svého excitačního nebo emisního maxima. Poměr intenzit fluorescence obou forem indikátoru (volná forma a komplex s  $\text{Ca}^{2+}$ ) v jejich excitačních nebo emisních maximech je potom nezávislý na koncentraci indikátoru v měřeném roztoku a závisí pouze na koncentraci volných iontů  $\text{Ca}^{2+}$ . U nepoměrových indikátorů je nutno pro výpočet koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$  znát aktuální koncentraci indikátoru v měřeném vzorku<sup>52, 54</sup>.

Širokou škálu fluorescenčních indikátorů excitovaných UV nebo viditelným světlem pro nejrůznější použití nabízí např. firma Molecular Probes<sup>55</sup>.

### 1.6.1 Fluorescenční sonda Fura-2

Pro měření vápenatých iontů jsem ve své práci používala v současnosti jednu z nejpoužívanějších sond, Fura-2.

Fura-2 je poměrový fluorescenční indikátor se dvěma excitačními vlnovými délkami. Byla odvozena ze struktury chelatačního činidla BAPTA. K výhodným vlastnostem Fura-2 patří možnost neinvazivního zanesení do buněk. To je zajištěno dočasným maskováním polárních  $\text{Ca}^{2+}$ -vázajících aminodiacetátových skupin ve formě acetoxymethylesterů. V této podobě má molekula sondy nepolární charakter a je schopna samovolně difundovat přes buněčnou membránu. Uvnitř buňky jsou esterické vazby rozštěpeny endogenními esterázami, sonda tak přechází do aktivní formy, je znovu polární a zůstává v buňce uvězněna (Obr. 11). Nepolární formu Fura-2 schopnou difuze buněčnou membránou prodává firma Molecular Probes pod označením Fura-2 AM<sup>14, 55</sup>.



**Obrázek č. 11: Vstup Fura-2 do buněk.** Fura-2 difunduje do buněk v podobě nepolárního acetoxymethylesteru (AM). Uvnitř buněk jsou esterické vazby rozštěpeny a sonda tak přechází do své polární,  $\text{Ca}^{2+}$ -citlivé formy (převzato z The Molecular Probes Handbook<sup>55</sup>)

Aplikace indikátoru ve formě jeho esteru však přináší některé komplikace a možnost vzniku artefaktů, z nichž nejzávažnější je vytěšňování indikátoru do určitých buněčných organel. Mezi další problémy spojené s fluorescenčními indikátory patří fotodestrukce („vysvěcování“, „photobleaching“), která snižuje jejich citlivost. Proto musí být vhodnou kombinací doby a intenzity excitace nalezena rovnováha mezi snižováním citlivosti a dostatečným poměrem signálu k šumu<sup>52</sup>.

Poměrový způsob měření však pomáhá obejít některé problémy, kterými může být zatíženo měření nepoměrových druhů fluorescenčních barviv. Není třeba uvažovat pokles signálu způsobený „vysvěcováním“ či rozkladem nebo extruzí barviva z buňky v průběhu experimentu. Jakákoliv změna v koncentraci aktivního barviva se totiž poměrem vyruší. Není ani důležité, aby byla koncentrace barviva stejná u všech měřených buněk. Vyloučení tohoto požadavku je obzvláště významné, protože umožňuje, aby byly buňky barveny

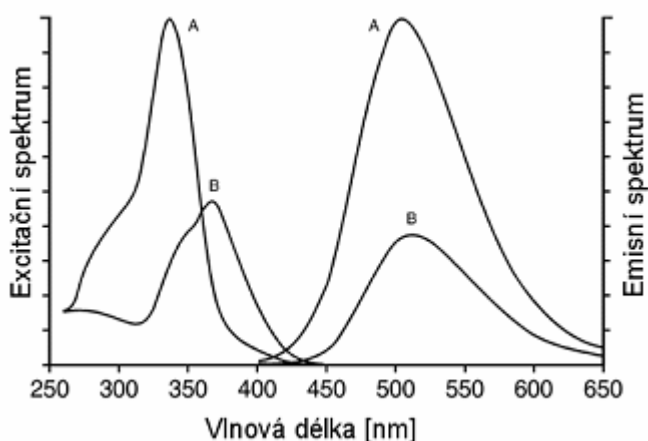
neinvazivním způsobem, který sice nezaručuje stejnoměrné obarvení, je ale vůči buňkám šetrný a měření pak probíhají za reálnějších fyziologických podmínek<sup>14</sup>.

Citlivost sondy závisí na míře afinity k iontům  $\text{Ca}^{2+}$ . Ta je vyjádřena hodnotou disociační konstanty  $K_d$  mezi volnými ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a sondou. Přesnost sondy potom závisí na poměru  $K_d$  pro vápenaté ionty a  $K_d$  pro ostatní divalentní ionty, zejména  $\text{Mg}^{2+}$ . Fura-2 má  $K_d$  pro vazbu iontů  $\text{Ca}^{2+}$  mimořádně vysokou (145 nM, iontová síla 0.1 M, pH 7.2, 20°C).

Jas signálu je vyjádřen kombinací hodnot absorpčního koeficientu a kvantového výtěžku barviva po navázání sledovaného iontu. Fura-2 má tyto hodnoty velmi dobré – molární extinkční koeficient  $31000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ <sup>55</sup> a kvantový výtěžek 0.49<sup>14, 56</sup>.

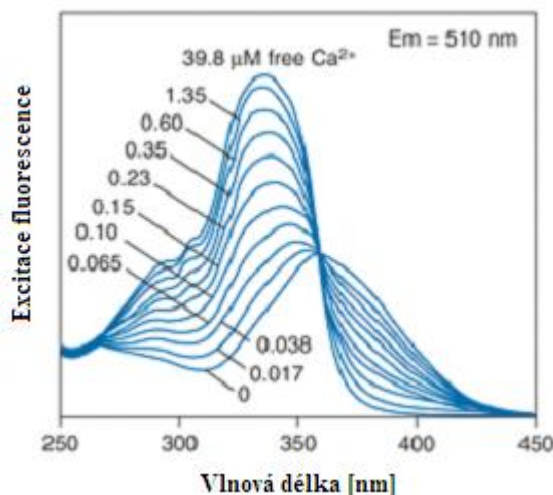
Mezi nejvýraznější faktory ovlivňující stabilitu signálu patří přítomnost divalentních iontů a iontů těžkých kovů ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ), přítomnost bílkovin, pH, iontová síla a teplota roztoku.

Stejně jako ostatní fluorescenční sondy má i Fura-2 modulární strukturu, v níž je ion vázající část molekuly (senzor) spojen s aromatickým kruhem, který je zodpovědný za emisi fluorescence (fluorofor). U Fura-2 tvoří vázající část dvě aminodiacetátové skupiny -  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2^-)$ , které v prostředí bez přítomnosti iontů  $\text{Ca}^{2+}$  leží ve stejné rovině jako aromatická část molekuly. Tím je maximalizována donace elektronů dusíku aminodiacetátu do aromatického systému. Situace se změní v okamžiku, kdy se ionty  $\text{Ca}^{2+}$  koordinačně navážou. Následkem toho dochází k vykroucení aminodiacetátových skupin z roviny a tím i ke snížení elektronové hustoty v aromatickém systému fluoroforu<sup>14</sup>. Úbytkem elektronů vzrůstá hodnota energie potřebné k excitaci molekuly, což se projeví posunem maxima absorpce z 362 nm (při 0  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) na 335 nm (při  $\geq 1,5 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ), zatímco emisní spektrum se posouvá jen minimálně, z 512 nm na 505 nm<sup>56</sup> (Obr. 12).



**Obrázek č. 12:** Excitační (vlevo) a emisní (vpravo) spektra  $\text{Ca}^{2+}$ -vázájící (A) a a volné (B) formy sondy Fura-2. Zatímco maximum excitačního spektra se vazbou iontů  $\text{Ca}^{2+}$  posouvá výrazně, poloha maxima emisního spektra se téměř nemění. (převzato z Vavra, 2005<sup>14</sup>)

Tvar excitačního spektra sondy je tedy přímo závislý na koncentraci volných iontů  $\text{Ca}^{2+}$  v jejím okolí (Obr. 13).



**Obrázek č. 13:** Excitační spektrum fluorescence Fura-2 v roztocích obsahujících 0 – 39,8  $\mu\text{M}$  volných iontů  $\text{Ca}^{2+}$ . Excitační spektrum sondy Fura-2 se s rostoucí koncentrací volných iontů  $\text{Ca}^{2+}$  posouvá ke kratším vlnovým délkám (převzato z The Molecular Probes Handbook<sup>55</sup>)

V průběhu pokusu je preparát obsahující sondu Fura-2 střídavě vystavován UV záření o vlnové délce 340 nm a 380 nm, které tak odděleně excitují volnou a vázanou formu barviva. Intenzita emitované fluorescence je v obou případech snímána při 512 nm ve formě obrazu pomocí CCD kamery. Poměr mezi intenzitami fluorescence vázané a volné formy ( $F_{340/380}$ ), který je vypočten počítačem, vypovídá o změnách  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ <sup>14</sup>.

### 1.6.2 Kalibrace fluorescenčního signálu

Pro určení intracelulární koncentrace volných iontů vápníku je nutné provést kalibraci fluorescenčního signálu měřením řady roztoků o známé koncentraci iontů vápníku. Takto získané hodnoty je nutné dosadit do kalibračních rovnic odvozených Grynkiewiczem<sup>56</sup>. (Tyto kalibrační rovnice jsou platné pouze pro barviva s poměrovým způsobem měření.)

Předpokládejme, že intenzita měřené fluorescence daného druhu barviva je přímo úměrná jeho koncentraci, tj. že se neuplatňuje tzv. efekt vnitřního filtru. To je splněno tehdy, když koncentrace barviva a optická dráha jsou dostatečně malé. Intenzita emitované fluorescence z objemu  $V$ , např. z jedné buňky s přítomností barviva, závisí na mnoha faktorech: počtu molekul barviva v objemu  $V$  –  $n$ , intenzitě zdroje záření  $I_0$ , účinnosti optického systému zachycovat emitované fotony –  $\Phi$ , kvantové účinnosti detektoru –  $Q_D$ ,

absorbčním koeficientu barviva –  $\varepsilon$  a kvantovém výtěžku barviva  $Q_F$ . Všechny faktory, které závisí na experimentálním uspořádání nebo na vlastnostech barviva, můžeme zahrnout do jediného konstantního faktoru  $S$ :

$$F = \Phi I_0 Q_D Q_F \varepsilon n = S n \quad (1)$$

V případě  $\text{Ca}^{2+}$ -sond musíme uvažovat 2 formy barviva – vázanou ( $b$  – bounded) a volnou ( $f$  – free), které se navzájem liší svým kvantovým výtěžkem a absorbčním koeficientem. Obě formy navíc měříme při dvou různých excitačních vlnových délkách  $\lambda_1$  a  $\lambda_2$ , takže pro popis tohoto systému jsou zapotřebí 4 faktory:  $S_{f1}$  – příspěvek volné formy barviva měřené při excitaci při vlnové délce  $\lambda_1$ ,  $S_{f2}$  – příspěvek volné formy barviva měřené při excitaci při vlnové délce  $\lambda_2$ , a  $S_{b1}$  a  $S_{b2}$  pro příspěvky vázané formy při vlnové délce excitace  $\lambda_1$  a  $\lambda_2$ . Tyto 4 faktory  $S$  lze vypočítat z měření intenzity fluorescence kalibračních roztoků o nulové koncentraci iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a koncentraci iontů  $\text{Ca}^{2+}$  saturujících všechny molekuly barviva. Při měření vzorků, kde se současně nacházejí molekuly indikátoru ve volné ( $n_f$ ) i vázané ( $n_b$ ) formě (jejich součtem získáme počet všech molekul barviva  $n_{tot} = n_f + n_b$ ), je celková intenzita fluorescence při excitaci ve dvou vlnových délkách dána výrazem (2):

$$F_1 = S_{f1}n_{f1} + S_{b1}n_{b1} \quad (2a)$$

$$F_2 = S_{f2}n_{f2} + S_{b2}n_{b2} \quad (2b)$$

Za předpokladu, že barvivo společně s ionty  $\text{Ca}^{2+}$  spolu reagují ve stechiometrii 1:1, můžeme napsat vztah (3):

$$n_b = \frac{n_f \cdot [\text{Ca}^{2+}]}{K_d} \quad (3)$$

kde  $K_d$  označuje efektivní disociační konstantu barviva.

Vzájemným podělením  $F_1/F_2$  je definován fluorescenční poměr  $R$ :

$$\begin{aligned} R &= \frac{F_1}{F_2} = \frac{(S_{f1}n_{f1} + S_{b1}n_{b1})}{(S_{f2}n_{f2} + S_{b2}n_{b2})} = \\ &= \frac{\left( S_{f1} + \frac{S_{b1} \cdot [\text{Ca}^{2+}]}{K_d} \right)}{\left( S_{f2} + \frac{S_{b2} \cdot [\text{Ca}^{2+}]}{K_d} \right)} = R \end{aligned} \quad (4)$$

Po úpravě dostaneme následující kalibrační rovnici (5):

$$[Ca^{2+}] = Kd \cdot \left( \frac{R - \frac{S_{f1}}{S_{f2}}}{\frac{S_{b1}}{S_{b2}} - R} \right) \cdot \left( \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (5)$$

Nyní je důležité si povšimnout, že výraz  $(S_{f1}/S_{f2})$  je vlastně limitující hodnotou pro  $R$  v případě nulové koncentrace iontů  $Ca^{2+}$  (členy  $n_b$  v rovnicích 2a, 2b jsou rovny nule), a můžeme jej proto nadále uvažovat jako  $R_{min}$ . Stejně tak je výraz  $(S_{b1}/S_{b2})$  limitní hodnotou  $R$  v situaci, kdy jsou všechny molekuly barviva satureovány ionty  $Ca^{2+}$  (členy v 2a, 2b obsahující  $n_f$  jsou rovny nule), můžeme jej proto považovat za  $R_{max}$ .

$$[Ca^{2+}] = Kd \cdot \left( \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \cdot \left( \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (6)$$

Poslední člen rovnice  $(S_{f2}/S_{b2})$  lze zaměnit za  $(F_{2\ min}/F_{2\ max})$ , tj. za hodnotu intenzity fluorescence naměřenou při excitaci v  $\lambda_2$  při nulové koncentraci iontů  $Ca^{2+}$  (v rovnici 2b je člen obsahující  $n_b$  roven nule,  $n_f = n_{tot}$ ) a při saturující koncentraci iontů  $Ca^{2+}$  (v rovnici 2b je člen obsahující  $n_f$  roven nule,  $n_b = n_{tot}$ ). Členy  $n_{tot}$  se v poměru vykrátí. Výsledná podoba kalibrační rovnice pro Fura-2 má proto následující tvar:

$$[Ca^{2+}] = Kd \cdot \left( \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \cdot \left( \frac{F_{380\ min}}{F_{380\ max}} \right) \quad (7)$$

K vlastnímu sestavení kalibrační křivky je tedy zapotřebí nejméně tří různých roztoků se známou koncentrací iontů  $Ca^{2+}$ . Roztoky s nulovou koncentrací  $Ca^{2+}$  a se saturující koncentrací iontů  $Ca^{2+}$  slouží k určení  $R_{min}$  a  $R_{max}$ . Třetí roztok se známou koncentrací iontů  $Ca^{2+}$  mezi těmito krajními hodnotami slouží k dopočtení efektivní rovnovážné disociační konstanty barviva  $K_d^{14, 56}$ .

K aplikaci kalibračních roztoků dochází vždy až po skončení vlastního pokusu, a způsob aplikace závisí na experimentálním uspořádání. Jednou z možností je aplikace pomocí pipet pro techniku terčíkového zámku, což je velice přesné, a dosahuje se tím definovaných intracelulárních koncentrací barviva, iontů  $Ca^{2+}$  pufru, tak i volných iontů  $Ca^{2+}$ . Druhou možností je vytvoření definované intracelulární koncentrace aplikací ionoforu, který proděraví buněčnou membránu, a umožní tak volný průchod iontům  $Ca^{2+}$ , o nichž se pak předpokládá, že zaujmou uvnitř buňky stejnou koncentraci jako v extracelulárním roztoku. K buňce je v přítomnosti ionoforu aplikován roztok s nulovou



koncentrací iontů vápníku ( $[Ca^{2+}]_e = 0 \text{ mM}$ ) a vysokou koncentrací iontů vápníku ( $[Ca^{2+}]_e = 20 \text{ mM}$ ) a hodnoty  $R_{min}$  a  $R_{max}$  jsou odečteny.

#### 1.6.2.1 Určení disociační konstanty barviva ze sondy Fura-2

Pro správnou kalibraci je zásadní přesné určení disociační konstanty barviva  $K_d$  ve studovaném druhu buněk. Toto stanovení je obtížné, protože hodnota  $K_d$ , která je vyjádřením afinity barviva k iontu v daných podmínkách, je závislá na konkrétních hodnotách teploty, iontové síly prostředí a na druhu použitého  $Ca^{2+}$ -pufru pro přípravu kalibračních roztoků. Tabulkové hodnoty při standardních podmínkách (iontová síla 0,1 a teplota 20°C nebo 25°C) musí být opraveny pro podmínky vlastního experimentu. Velké problémy působí závislost  $K_d$   $Ca^{2+}$ -pufru použitého pro přípravu kalibračních roztoků na pH. Nejpoužívanější pufr EGTA je vysoce citlivý – chybné určení pH o 0,1 jednotky může způsobit chybu v hodnotě vypočteného  $K_d$  téměř 50 %. Z toho důvodu je pro přípravu kalibračních roztoků doporučován BAPTA,  $Ca^{2+}$ -pufr, který je na pH prostředí méně citlivý než např. EGTA. Afinitu barviva dále ovlivňuje přítomnost dalších bivalentních iontů –  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , a mikroviskozita prostředí<sup>55</sup>. Čistota kalibračních roztoků je proto rovněž důležitá<sup>14</sup>.

Závěrem těchto úvah je doporučení, že kalibrace by měla svým provedením co nejvíce napodobovat podmínky vlastních experimentů.

### 1.7 Imunoradioizotopové metody pro stanovení sekrece LH

Sekreci hypofyzárních hormonů, která je stimulovaná zvýšením  $[Ca^{2+}]_i$ , lze stanovit pomocí radioimunologického měření po odebrání vzorku média nad kulturou hypofyzárních buněk. Radioimunoanalýza (RIA) neboli radioimunologická stanovení zahrnují takové metody radioizotopové mikroanalýzy, jejichž základem je imunochemická reakce antigenu (Ag) se specifickou protilátkou (Ab), prováděná *in vitro* v přítomnosti vhodné radioaktivně značené sloučeniny jako radioindikátoru, který umožňuje kvantifikaci stanovení na základě určení distribuce aktivity<sup>57</sup>. Jedná se o metodu, pomocí které byla v 50. letech 20. století v USA poprvé zjištěna hladina inzulinu v krvi *in vitro*. Jednalo se o vůbec první kvantitativní stanovení hladiny hormonu v krvi. Za tento objev obdržela Rosalyn Sussman Yalow v roce 1977 Nobelovu cenu za medicínu. Tím, že bylo možné přesně změřit hladinu inzulinu v krvi, se léčba choroby diabetes mellitus posunula o



výrazný kus dopředu. Dodnes se radioimunoanalýza používá nejčastěji v klasickém uspořádání<sup>58</sup>.

Imunoradioizotopové metody se vyznačují především vysokou citlivostí a specificitou. Strukturní specificitou rozumíme mimořádnou schopnost vhodně zvolené protilátky rozlišit a specificky se vázat pouze na “antigenní místa” (epitopy) molekuly analytu. Použití radionuklidu ( $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ) k označení analytu nebo protilátky umožňuje sledovat vazebnou reakci mezi velmi malými počty molekul, kterou je dána vysoká citlivost metody. Praktické provedení RIA-metody je relativně jednoduché. Částečná automatizace umožňuje zpracovávat velké série vzorků. Důležitou výhodou je také, že pro analýzu je dostačující i velmi malé množství vzorku (obvykle 10 – 100  $\mu\text{l}$ ) a je cenově dostupná. Kombinace vysoké citlivosti a specifčnosti spojená s relativní jednoduchostí provedení vede k tomu, že ani současná celosvětová radiofobie ještě nevytlačila radioimunologické metody z arzenálu lékařské diagnostiky. Naopak došlo k expanzi do oborů, jako jsou potravinářský průmysl a zemědělství, ochrana životního prostředí nebo soudní lékařství. Pomocí těchto metod je možné stanovit teoreticky každou látku, proti které lze připravit odpovídající protilátku. V úvahu přicházejí především vzorky krevního séra, mozkomíšního moku, moči, či dalších tělních tekutin nebo tkáňových extraktů<sup>57, 58</sup>.

K nevýhodám lze naopak uvést, že specificita za určitých podmínek nemusí být absolutní a mohou se vyskytnout konkurenční imunochemické reakce (zkřížená reaktivita). Imunoreaktivita radioaktivně značené molekuly nemusí být identická s neznačenou molekulou. V úvahu je nutné vzít i fakt, že se v případě protilátek jedná o molekuly s biologickou aktivitou, která klesá v přítomnosti zdroje ionizujícího záření, především v důsledku radiolytických procesů, které vedou k destrukci či modifikaci původně použitého skeletu. Vlastní inkorporace radioaktivní značky může rovněž snížit biologickou aktivitu a imunoreaktivitu molekuly, ať už přítomností nově vázaného atomu či skupiny atomů nebo, což je častější případ, může být snížení bioaktivity způsobeno interakcí chemických činidel použitých pro zavedení atomu radionuklidu do biosubstrátu<sup>57, 58</sup>.

Přestože stanovení metodou RIA je v současné době založeno na použití komerčně dodávaných souprav (RIA-kitů) obsahujících kompletní sadu reagensů a protilátkou potažených zkumavek, je vhodné poukázat na některé teoretické aspekty vlastní konstrukce stanovení RIA<sup>58</sup>.

#### a) Příprava protilátek

Živé organismy reagují na řadu xenobiotických podnětů tvorbou protilátek. Tento jev je součástí biologického informačního systému živých organismů. Látky, které navozují takovou imunitní odpověď se nazývají antigeny a jejich funkční formy imunogeny. Obecně se imunogen skládá z makromolekulárního nosiče většinou syntetického původu, nízkomolekulárních sloučenin nazývaných hapteny a antigenních determinant. Nízkomolekulární sloučeniny (hapteny) v tomto smyslu často působí ve funkci antigenního determinantu. Z uvedeného vyplývá, že ke konstrukci imunogenu je nutné připravit makromolekulární (polymerní nosič) a na něj kovalentně vázat nízkomolekulární látku. Metodika tohoto postupu přesahuje rámec zjednodušeného výkladu, nicméně je třeba si uvědomit, že použitou nízkomolekulární látkou je právě taková molekula, proti které chceme připravit protilátky. Vlastní proces imunizace spočívá v jednorázové či opakované injekci imunogenu ve vhodném adjuvans do živého organismu (myš, králík, slepice) a po určité době (většinou měsíce) se izolují protilátky. Získaná surová protilátka se čistí a její imunoreaktivita se stanoví na základě její afinity k výchozímu imunogenu či haptenu. Na uvedených principech jsou založeny i další modifikace metody RIA<sup>58</sup>.

#### b) Zavedení radioaktivního atomu do molekuly

I když je principiálně možné pro značení stanovované molekuly použít jakýkoli radionuklid, v praxi a komerčních soupravách se používá především <sup>125</sup>I, v některých případech i <sup>3</sup>H. Zavedení <sup>3</sup>H do molekuly znamená buďto izotopovou výměnu nebo syntézu z tritiovaného prekursoru, zavedení <sup>125</sup>I do molekuly bývá podstatně jednodušší v případech, kdy značená molekula obsahuje aromatické jádro. Pro jodace takových molekul byla vypracována řada postupů, které jsou jednoduché a zahrnují v principu dva kroky, první jodační a druhý separační, kdy je z jodační směsi izolována potřebná jodovaná látka. Jodační krok pro zavedení halogenového atomu na aromatické jádro spočívá v in situ generování elektrofilu I<sup>+</sup> z komerčně dodávaného Na<sup>125</sup>I a provádí se několika způsoby. Prvním je tzv. chloraminová metoda, kdy je oxidační schopnost chloraminu využita k oxidaci I<sup>-</sup> na I<sup>+</sup>. Reakce se provádí v alkalickém pufru, přičemž hodnota pH pro optimální výtěžek se liší v závislosti na typu aromátu resp. zbytku značené molekuly. Obdobnou reakcí je proces využívající komerčně dodávaný Iodogen, který je ve vodě a pufrech nerozpustný, před reakcí se sorbuje na stěny reakční nádoby a ukončení reakce lze provést přenesením reakční směsi do jiné Iodogenem neimpregnované nádoby. Jemnou metodou je použití laktoperoxidasy. V souvislosti s oxidačním prostředím je nutné vzít v úvahu i fakt, že mnohé biomolekuly mohou být v průběhu reakce oxidačně poškozeny a ztrácet

imunoreaktivitu. Řešením je poměrně krátký čas jodační reakce (řádově v sekundách), či použití jemnější metody např. s enzymem laktoperoxidasou. Separace značené látky se provádí chromatografickými metodami (LC, HPLC) na vhodných sorbentech (u velkých molekul gelová filtrace, u malých molekul chromatografie na C-18 sorbentu)<sup>58</sup>.

#### c) Měření radioaktivity

Vyhodnocení radioaktivity se provádí běžnými detekčními metodami. Pro  $\beta$ -zářiče je nejvýhodnější kapalinová scintilace (LSC), pro  $\gamma$ -zářiče se nejčastěji používá detektor NaI(Tl) ve studnovém uspořádání. Na principu těchto metod jsou založeny i jednoúčelové přístroje pro RIA-stanovení vybavené automatickými vyhodnocovacími systémy<sup>58</sup>.

#### d) Vyhodnocení kalibrační závislosti

Přestože existuje řada počítačových programů pro konstrukci kalibrační křivky a vlastní vyhodnocení, lze poměrně jednoduše výsledky vyhodnotit na základě manuální konstrukce uvedené závislosti. Lze rovněž použít běžně dostupné programy pro konstrukci křivek ze zadaných bodů jako např. Origin nebo Excel.

Nejjednodušší vyhodnocení je pomocí „lin-lin“ závislosti, kdy na osách se v lineárním měřítku vynášejí koncentrace a naměřený počet impulsů ( $x$  = koncentrace,  $y$  = imp/min). Pro odečítání v okrajových oblastech je však křivka příliš strmá (hyperbola) a tak další transformace vedou k částečné linearizaci vztahu koncentrace  $x$  zjištěný počet impulsů. Lepších výsledků lze dosáhnout v „log-lin“ závislosti (koncentrace v logaritmickém měřítku na ose  $x$ ). Hodnota počtu impulsů se vynášejí buďto jako taková nebo se transformuje poměrem  $B/B_0$ ,  $(B-N)/(B_0-N)$ ,  $((B-N)/(B_0-N))*100$ , resp  $B/T$ , kde  $B$  je aktivita vázaná na protilátku (vazebnost),  $B_0$  vazebnost při nulové koncentraci látky (eliminuje nespecifické vazby na protilátku),  $N$  je nespecifická vazba a konečně  $T$  je celková aktivita přidaná do každé testovací zkumavky. Ve všech případech je výsledkem křivka sigmoidního charakteru.

Složitější transformací je konstrukce křivky „logit-log“, která vede prakticky k linearizaci kalibračního vztahu. Y-osa je potom definována vztahem

$$\text{logit } B/B_0 = \log e (B/B_0)/(1-B/B_0))$$

Poměr  $B/B_0$  se mění v intervalu 0 - 1,0. Protože však  $\text{logit } 1 = \infty$  a  $\text{logit } 0 = -\infty$ , vynášejí se hodnota  $B_0 = 1$  jako 0,99.

Existuje řada dalších linearizačních transformací, které se však používají ve vyhodnocovacích programech a pro manuální vyhodnocení jsou příliš složité. Uvedené transformace postačují pro běžná vyhodnocení. Pro vlastní přesnost, správnost a

reprodukovatelnost výsledku jsou význačnější parametry vlastního zpracování vzorku při provádění analýzy. Při sériových rutinních stanoveních se do souboru měřených vzorků přidávají kontrolní, uměle připravené vzorky se známou koncentrací („quality control“), které umožňují vyhodnotit míru správnosti stanovení v průběhu analýzy velké série vzorků<sup>58</sup>.

## 2 Cíl práce

V této práci jsem se pomocí mikrofluorimetrického měření změn  $[Ca^{2+}]_i$  po aplikaci extracelulárního ATP v neonatálních hypofyzárních buňkách potkana a pomocí radioimunologického měření LH pokusila zjistit:

- 1) Zda smíšená populace neonatálních hypofyzárních buněk obsahuje purinergní receptory P2 a jaké procento ze všech neonatálních buněk odpovídá na aplikaci extracelulárního ATP a také jaké procento všech buněk odpovídá na aplikaci GnRH a TRH.
- 2) Jaká je citlivost GnRH- a TRH-citlivých buněk k aplikaci extracelulárního ATP.
- 3) Zda jsou neonatální hypofyzární buňky citlivé také k jiným agonistům purinergních receptorů, především k ADP, BzATP a 2 MeSATP, a jaké jsou rozdíly v citlivosti GnRH- a TRH- citlivých neonatálních hypofyzárních buněk k ADP, agonistovi receptorů P2Y.
- 4) Jaký je vliv inhibitorů purinergních receptorů, BDBD a PPADS, na ATP-odpovědi v hypofyzárních buňkách, a ve kterých podtypech sekrečních buněk tyto inhibitory působí.
- 5) Sledovat účinek ATP na sekreci LH v kultuře neonatálních hypofyzárních buněk pomocí metody RIA. Zaměřit se na porovnání účinku ATP na bazální sekreci LH a na GnRH-stimulovanou sekreci LH.

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Příprava buněk z hypofýzy potkana

K pokusům byli použiti laboratorní potkani kmene LR Wistar chovaní v automaticky řízeném světelném režimu LD 12:12 (12 hodin světla a 12 hodin tmy), s dobou rozsvícení v 6.00 hod. a dobou zhasnutí v 18.00 hod. Zvířata byla krmena a napájena *ad libitum*, měla volný přístup k vodě a krmení. K pokusům byli používáni potkani staří 4 - 7 dní.

##### 3.1.1 Příprava roztoků

Pro přípravu kultivačního média M199 + FBS, potřebného k izolaci buněk z hypofýzy, bylo potřeba:

44,5 ml média 199 (M199) (Gibco) provzdušněného směsí 95 % O<sub>2</sub> a 5 % CO<sub>2</sub>

0,5 ml roztoku Penicilin-Streptomycin (P/S; 10 000 jednotek P/ 10 000 µg S/ 1 ml)  
(Invitrogen)

5 ml telecího séra („Fetal bovine serum“, FBS) (Sigma)

K přípravě izolačních médií bylo potřebné připravit celkem 3 zásobní roztoky. První zásobní roztok, kterým byla DNAsa I (5 mg/ml), II stupně z hovězího pancreasu (Roche), byl připravený rozpuštěním 5 mg DNasy I v 1 ml destilované vody. Roztok byl sterilně přefiltrován. Druhý zásobní roztok, kterým byl trypsinový inhibitor (TI; 25 mg/ml) (Sigma), byl připravený rozpuštěním 25 mg TI v 1 ml destilované vody a následně sterilně přefiltrován. Posledním zásobním roztokem byl hovězí sérový albumin (200 mg/ml) (BSA) (Sigma), který byl připravený rozpuštěním 200 mg BSA v 1 ml destilované vody a sterilně přefiltrován.

K izolaci hypofyzárních buněk bylo následně potřebné připravit 5 různých izolačních médií.

K přípravě izolačního média EBSS + EDTA bylo potřeba:

37,2 mg EDTA (Sigma)

200 ml Earleho balanční soli (EBSS – Earle's balanced salt) (Sigma).

K přípravě izolačního média 10/10 bylo potřeba:

6 ml izolačního média EBSS + EDTA provzdušněného směsí 95 % O<sub>2</sub> a 5 % CO<sub>2</sub>

60 ml TI ze zásobního roztoku.

K přípravě izolačního média 1/1 bylo potřeba:

9 ml izolačního média EBSS + EDTA provzdušněného směsí 95 % O<sub>2</sub> a 5 % CO<sub>2</sub>

120 ml DNAsy I ze zásobního roztoku

1 ml izolačního média 10/10.

K přípravě izolačního média P bylo potřeba:

5 ml izolačního média EBSS + EDTA provzdušněného směsí 95 % O<sub>2</sub> a 5 % CO<sub>2</sub>

60 ml DNAsy I ze zásobního roztoku

0,7 mg cysteinu (Sigma)

10 mg lyofilizovaného papainu (Worthington biochemical corporation).

K přípravě izolačního média M bylo potřeba:

13 ml média M199 provzdušněného směsí 95 % O<sub>2</sub> a 5 % CO<sub>2</sub>

130 ml roztoku P/S.

Izolační média po celou dobu izolace tkáně a buněk byla uchována na ledu.

#### Příprava kultivačních skel

Skla pro kultivaci buněk byla potažena vrstvou 0,01 % poly-L-lysinu (P-L-L) (Sigma). Pro kultivaci byla použita 12 mm mikroskopická skla (Glaswarenfabrik GmbH&Co.), která byla nejdříve opláchnuta v destilované vodě a ponořena na 45 minut do lázně obsahující 30 % kyselinu dusičnou, pak znovu opláchnuta v destilované vodě. V dalším kroku byla použita lázeň obsahující 30 % kyselinu sírovou spolu se 70 % etanolem, do které byla skla vložena. Následoval 3x po sobě se opakující oplach v destilované vodě. Potom byla skla opláchnuta v 70 % etanolu a ponechána oschnout. Suchá skla byla ponořena na 60 minut do lázně obsahující 0,01 % P-L-L. Po uvedené době byla opět 3x opláchnuta destilovanou vodou a nakonec 18 hodin sterilizována pod UV světlem. Kultivační skla byla sterilně uchovávána v Petriho misce 35x10 mm (NUNC).

#### **3.1.2 Izolace buněk z hypofýzy**

Všechna použitá média, roztoky, kultivační plata, kultivační skla, nástroje a potřebný laboratorní plast byly sterilní. Všechny přípravné i pokusné postupy probíhaly za sterilních podmínek. Izolační média po celou dobu izolace tkáně a buněk byla uchována na ledu.

Potkani byli usmrceni dekapitací. Vyjmuté hypofýzy byly izolovány do izolačního média M. Izolační médium P bylo 10 minut inkubováno v termostatu v atmosféře syčené

95 % O<sub>2</sub> s 5 % CO<sub>2</sub> při teplotě 37°C pro aktivaci papainu. Pak do něj byly „přetaženy“ hypofýzy z izolačního média M, probíhala inkubace po dobu 45 minut v inkubátoru v atmosféře syčené 95 % O<sub>2</sub> s 5 % CO<sub>2</sub> při teplotě 37°C. Po vyjmutí pak bylo odsáto od hypofýz médium P a přidáno 2 ml izolačního média 1/1. Pomocí Pasteurovy skleněné pipety byly hypofýzy postupně titrovány na jednotlivé buňky. Centrifugací (1000 RPM/ 5 minut) byly buňky separovány od média, které bylo následně odsáto. Sediment buněk byl rozsuspendován ve 2 ml izolačního média 1/1 a opatrně navrstven na izolační médium 10/10. Centrifugací (1000 RPM/ 10 minut) byly buňky separovány a médium odsáto. Sediment byl rozsuspendován v 5 ml kultivačního média M199 + FBS a pomocí Bürkerovy komůrky bylo spočítáno celkové množství získaných buněk. Na jedno kultivační sklo umístěné v Petriho misce pak bylo nanášeno 70 000 buněk. Skla s buňkami byla 90 minut inkubována v inkubátoru v atmosféře syčené 95 % O<sub>2</sub> s 5 % CO<sub>2</sub> při teplotě 37°C a poté zalita 1,5 ml ohřátého (37°C) a saturovaného (CO<sub>2</sub>) kultivačního média M199 + FBS. Takto připravené buněčné kultury pak byly inkubovány v inkubátoru v atmosféře syčené 95 % O<sub>2</sub> s 5 % CO<sub>2</sub> při teplotě 37°C a po 3 hodinách stabilizace je bylo možné použít k pokusu.

### **3.2 Vlastní měření koncentrace intracelulárních iontů vápníku metodou mikrofluorimetrie**

#### **3.2.1 Použité přístroje**

##### Fluorescenční mikroskop

Ústředním přístrojem aparatury byl fluorescenční mikroskop Olympus BX50WI (USA), vybavený křemennou optikou pro měření v UV oblasti spektra. Mikroskop byl vybaven dvěma imerzními objektivy se zvětšením 10x a 40x. V optické dráze mikroskopu byly umístěny optické filtry zodpovědné za spektrální rozlišení excitačního záření přiváděného ze zdroje a emitovaného záření registrovaného CCD kamerou (Princeton Instruments, Inc., New Jersey, USA) obsahující čip CCD, pro snímání obrazové informace, pracující na principu fotoefektu.

##### Zdroj excitačního záření

Jako zdroj excitačního záření byla použita osvětlovací jednotka Polychrome II, výrobek firmy Photonics (Mnichov, Německo). Vlastní zdroj tvořila xenonová lampa o výkonu 75



W, jejíž záření bylo přiváděno na mřížkový monochromátor umožňující rychlé nastavení zvolené vlnové délky v rozsahu 260 - 680 nm. Rychlost přepnutí byla 2 – 3 ms, spektrální šířka pásma 12 – 15 nm. Monochromátorem vybrané záření bylo křemenným světlovodičem přiváděno do optické soustavy mikroskopu.

#### CCD kamera

Snímaný obraz byl digitalizován pomocí CCD kamery MicroMax typu RTE/CCD-728-4 (Princeton Instruments, Inc., New Jersey, USA) s 12-bitovým rozlišením intenzity signálu. Kamera byla umístěna v horní části mikroskopu v jeho optické ose. Pro potlačení šumu byl detektor kamery ochlazován vestavěnými Peltierovými články na teplotu – 20°C.

#### Aplikačný systém

Aplikované látky byly na povrch hypofyzárních buněk přiváděny pomocí rychlého gravitačního aplikačního systému, který se skládal z deseti křemenných (Composite metal services, Velká Británie) paralelně spojených trubiček se společným vyústěním do koncové trubičky o vnitřním průměru 320 nm. Každá trubička byla spojena teflonovou hadičkou s vlastní 10 ml nádržkou obsahující aplikovaný roztok. Průtok aplikovaných roztoků jednotlivými trubičkami byl řízen solenoidovými ventily (General Valves, USA) ovládanými mikroprocesorem (Ing. I. Ditter a V. Vlachová, FGÚ AVČR, Praha). Rychlost průtoku aplikačním systémem činila přibližně 0,4 ml/min.

### **3.2.2 Roztoky pro měření koncentrace intracelulárních iontů vápníku**

#### Extracelulární roztok (ECS)

Jako základní kontrolní a aplikační roztok byl používán extracelulární roztok. Na celkový objem 1 l extracelulárního roztoku bylo potřeba:

8,298 g (142 mM) NaCl

0,223 g (3 mM) KCl

2 ml (2 mM) CaCl<sub>2</sub>

1 ml (1 mM) MgCl<sub>2</sub>

2,383 g (10 mM) HEPES

1,800 g (10 mM) D-glukosa

Takto připravený roztok byl pufrován na pH 7,3 1M hydroxidem sodným (NaOH). Osmolalita roztoku se pohybovala mezi 290 – 300 mOsm (= miliosmoly – jednotka osmotické aktivity). Roztok byl připraven ve větším množství, rozdělen po cca 500 ml do polyethylenových láhví, zmražen při -20 °C a takto skladován pro další použití max. 3 měsíce.

Tento roztok byl používán také jako aplikační roztok. Aplikované látky byly připraveny ve formě koncentrovaných zásobních roztoků a zamraženy. Před pokusem byly rozředěny aplikačním roztokem na požadovanou koncentraci.

### Použité látky

**Tabulka č. 6: Seznam použitých látek pro měření koncentrace intracelulárních iontů  $\text{Ca}^{2+}$**

Látka	Účinek, funkce	Zásobní roztok
Fura-2 AM (acetoxymethylester)	$\text{Ca}^{2+}$ -citlivá fluorescenční sonda	-
Pluronic F-12	detergent pro fluorescenční sondy	0,2% roztok v DMSO
NaCl	pro přípravu ECS	-
KCl	pro přípravu ECS	-
$\text{CaCl}_2$	pro přípravu ECS	1 M
$\text{MgCl}_2$	pro přípravu ECS	1 M
HEPES (kyselina N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonová])	pufř pro přípravu ECS	-
D-glukosa	pro přípravu ECS	-
NaOH	pro kalibraci ECS	-
ATP	agonista purinergních receptorů	100 $\mu\text{M}$
GnRH	hormon uvolňující gonadotropiny	1 nM
TRH	hormon uvolňující tyreotropin	100 nM
BzATP	agonista receptorů $\text{P2X}_7$	100 $\mu\text{M}$
ADP	agonista receptorů $\text{P2Y}$	100 $\mu\text{M}$
2 MeSATP	agonista receptorů $\text{P2X}$	100 $\mu\text{M}$
BDBD	antagonista receptorů $\text{P2X}_4$	10 $\mu\text{M}$
PPADS	antagonista receptorů $\text{P2X}$	10 $\mu\text{M}$

### Barvicí roztok pro barvení neonatálních buněk hypofýzy

Neonatální hypofyzární buňky ve 2 ml extracelulárního roztoku byly barveny přidáním 5  $\mu$ l 0,2% roztoku „Pluronic acid“ v dimethylsulfoxidu (DMSO) a 2  $\mu$ l Fura-2 AM (od firmy Invitrogen) (příprava 2  $\mu$ M fluorescenčního barviva Fura-2 AM: 50  $\mu$ g Fura-2 AM + 50  $\mu$ l DMSO), inkubace 30 minut při 37°C a 20 minut při laboratorní teplotě a ve tmě.

### **3.2.3 Fluorescenční měření změn koncentrace volných iontů $\text{Ca}^{2+}$**

Pro fluorescenční měření byly neonatální hypofyzární buňky na sklíčko přeneseny do jamky měřicí plexisklové komůrky, která byla následně uchycena do stolku mikroskopu. Do její jamky byla zavedena perfuse extracelulárního roztoku, vyústění aplikačního systému a odsávání. Uchycení komůrky bylo důležité pro stabilizaci snímaného obrazu, jelikož prostředí jamky bylo mechanicky ovlivňováno proudy aplikovaných látek.

Pod objektivem zvětšujícím 10x byly vyhledávány cílové oblasti a byla nastavena poloha vyústění aplikačního systému do těsné blízkosti nad sklíčko s buňkami v úhlu přibližně 30°. Pod objektivem se zvětšením 40x již bylo možno pozorovat jednotlivé buňky. Při fluorescenčním měření byly vypnuty všechny zdroje silného přímého světla.

Pomocí aplikačního systému byly podávány jednotlivé látky. Buňky byly v průběhu měření vystaveny střídavým expozicím excitujícího záření 340 nm (30 ms) a 380 nm (60 ms) s frekvencí opakování 0,9 Hz. Intenzita vyvolané fluorescence byla snímána pomocí CCD kamery. CCD kamerou byl měřený obraz digitalizován a odeslán do řídicího počítače, kde byl ukládán a on-line zobrazován.

Látky byly aplikovány v přesně definovaných sekvencích.

Pro zkoumání citlivosti buněk neonatální adenohipofýzy k ATP a citlivosti GnRH- a TRH- citlivých buněk k ATP byly látky aplikovány ve sledu ATP (100  $\mu$ M) – GnRH (1 nM) – TRH (100 nM). Pro srovnání ATP-odpovědi s ADP, BzATP a 2 MeSATP ve smíšené populaci neonatálních hypofyzárních buněk byly látky aplikovány ve sledu ATP (100  $\mu$ M) – ADP (100  $\mu$ M) nebo BzATP (100  $\mu$ M) nebo 2 MeSATP (100  $\mu$ M) – ATP (100  $\mu$ M). Pro zkoumání rozdílu mezi TRH- a GnRH-citlivými buňkami v jejich citlivosti k ADP byly látky aplikovány v sekvenci ATP (100  $\mu$ M) – ADP (100  $\mu$ M) – ATP (100  $\mu$ M) – GnRH (1 nM) – TRH (100 nM). Pro zkoumání vlivu inhibitorů receptorů P2X na ATP-odpovědi byly látky aplikovány v sekvenci ATP (100  $\mu$ M) – BDBD (10  $\mu$ M) nebo PPADS (10  $\mu$ M) – ATP (100  $\mu$ M). Pro zkoumání rozdílu mezi TRH- a GnRH-citlivými buňkami

v jejich citlivosti k BDBD byly látky aplikovány ve sledu ATP (100  $\mu$ M) – BDBD (10  $\mu$ M) – ATP (100  $\mu$ M) – GnRH (1 nM) – TRH (100 nM).

Při měření byly dodržovány některé pravidla – mezi dvěma následujícími aplikačními sekvencemi byl udržován časový rozestup nejméně 180 vteřin. Následující látka v sekvenci byla aplikována vždy teprve až po ustálení měřeného signálu odpovědi intracelulárního vápníku na předcházející aplikaci.

### **3.2.4 Zpracování dat**

#### **3.2.4.1 Zpracování obrazu fluorescence vzorku**

Sledovaný obraz fluorescence vzorku byl CCD kamerou digitalizován a ukládán v řídicím počítači v podobě obrazových souborů, zvlášť pro vlnové délky 340 nm a 380 nm. Jejich následné „off-line“ vyhodnocení bylo prováděno s pomocí programu MetaFluor, verze 4.01 (Universal Imaging Corp., USA).

Při hodnocení byly na měřených obrazech ohraničeny oblasti reagujících buněk, ze kterých byla programem MetaFluor určena hodnota poměru intenzit fluorescence při 340 nm a 380 nm (F340/380) v každém okamžiku měření. V jednom pokuse bylo možné na snímaném obraze vyhodnotit najednou 3-16 buněk. Číselná data byla dále exportována do prostředí programu MS Excell, kde bylo provedeno vyhodnocení a grafická prezentace výsledků.

#### **3.2.4.2 Vyhodnocení výsledků získaných metodou mikrofluorimetrie**

Jelikož na neonatálních hypofyzárních buňkách nebylo možné provést přesnou kalibraci fluorescenčního signálu (buňky jsou malé a křehké, nevydrží permabilizaci ionoforem a opakované aplikace nefyziologických roztoků s nulovou koncentrací iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a 20 mM koncentrací iontů  $\text{Ca}^{2+}$  saturující všechny molekuly barviva) jsou měřená data uváděna jako poměr intenzit fluorescence při excitaci v 340 nm a 380 nm (F340/380), který bezprostředně vypovídá o změnách koncentrace intracelulárních iontů vápníku. Bylo však nutné zvolit alternativní způsob vyhodnocení, který by umožnil kvantifikovat změny, ke kterým v buňce dochází. Použili jsme následující postup:

Za odpověď buňky na aplikovanou látku byla považována pouze taková změna fluorescenčního signálu po podání látky, která nejméně o 0,05 rel. jednotky F340/380 převyšovala hodnotu bazální fluorescence. Hodnota bazální fluorescence byla vždy určena jako průměr z 10 hodnot před aplikací testované látky, hodnota fluorescence očekávané

odpovědi po podání testované látky jako průměr z 5 hodnot z pozorovaného maxima odpovědi.

V pokusech byly vyhodnocovány pouze tyreotropní a gonadotropní buňky, tedy buňky, které odpovídaly zvýšením koncentrace intracelulárních iontů vápníku na aplikaci 100  $\mu$ M ATP, 100 nM TRH nebo 1 nM GnRH.

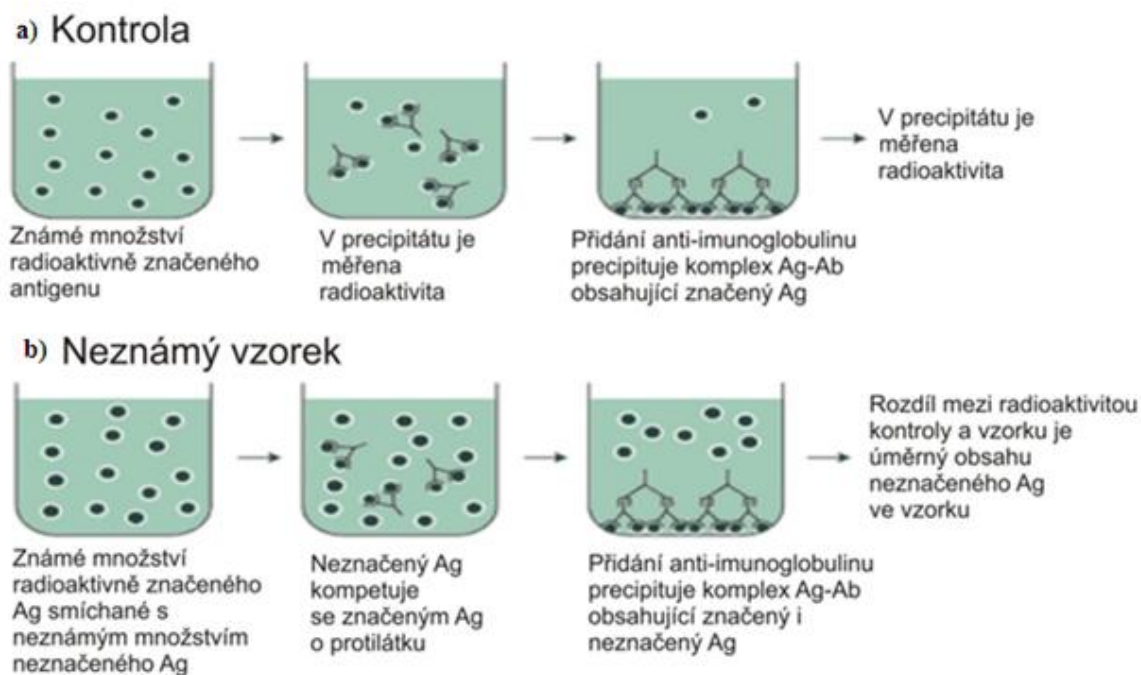
### **3.3 Stanovení LH metodou RIA**

#### **3.3.1 Princip metody**

Jedná se o kompetitivní heterogenní imunoreakci, tzn. že značený antigen Ag\* soupeří o vazebná místa na protilátce Ab, která se v reakční směsi nachází v omezeném množství, s neznačeným antigenem Ag. Stanovovaná látka (LH) je v tomto případě neznačený antigen, další antigen je značen radioaktivním izotopem iodu  $^{125}\text{I}$  („ $^{125}\text{I}$ -LH tracer“). Proti stanovované látce Ag máme připravenou specifickou protilátku Ab (anti LH). K stanovování tedy potřebujeme vzorek, rLH standard, LH pro jodaci, primární protilátku anti LH a sekundární protilátku.

Výsledkem reakce je vznik dvou komplexů: značený antigen - protilátka (Ag\*-Ab) a neznačený antigen - protilátka (Ag-Ab), přičemž rovnovážné konstanty pro oba děje jsou shodné. Množství značeného komplexu (Ag\*-Ab) je nepřímo úměrné množství stanovovaného antigenu Ag, čili čím více stanovované látky se ve vzorku nachází, tím menší množství značeného komplexu vznikne a tím menší bude výsledný signál. Pokud tedy připravíme komplex Ag\*-Ab a k němu přidáme roztok obsahující stanovovanou látku Ag dojde k vytěsnění části molekul Ag\* a tím vznikne z původního Ag\*-Ab komplex Ag-Ab (Obr. 14). Toto si lze jednoduše vysvětlit tím, že značené antigeny se nenaváží na protilátku pro nedostatek vazebných míst, která obsadí neznačený antigen. Z uvedených poznatků také vyplývá, že se v reakční směsi nacházejí i volné formy Ag a Ag\*. Celková reaktivita (T) se tak rozdělí do dvou frakcí - vázané (B) a volné (F), přičemž platí:  $T = B + F$ <sup>59</sup>.

Pro kvantitativní stanovení určité látky ve vyšetřovaném vzorku je třeba vytvořit kalibrační křivku, která odráží závislost množství radioaktivity v komplexu s protilátkou na množství přidané stanovované látky. Kalibrační křivku připravujeme z tzv. standardů látky Ag o definované koncentraci. Nedílnou součástí stanovení jsou i kontroly, kde předem známe velikost radioaktivity<sup>57</sup>.



**Obrázek č. 14.:** Grafické znázornění kontrolní (a) a neznámé (b) vzorky. (Převzato z článku Radioimunoanalýza<sup>57)</sup>)

### 3.3.2 Roztoky a přísady pro stanovení sekrece LH metodou RIA

Pro větší přehled a jednodušší orientaci jsem potřebné roztoky a přísady zaznamenala do následující tabulky:

**Tabulka č. 7: Roztoky a přísady potřebné pro měření RIA**

Fosfátový pufr – základní	Složení: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1000 mM NaCl a $\text{NaN}_3$ pH 7,4	Na 1000 ml bylo potřeba 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 5,84 g NaCl a 0,6 g $\text{NaN}_3$ kontrola pH týdně
Fosfátový pufr – pracovní	Složení: základní fosfátový pufr + 1 % NRS	Na 50 ml základního pufru bylo potřeba 0,5 ml NRS (aliquoty NRS 0,5 ml při $-20^\circ\text{C}$ )
M 199	Pufr (nutriční zdroj pro buněčné kultury)	
7,5 % roztok PEG v Tris pufru	Složení: PEG (Mr 8000) a 25 mM Tris pufr pH 8,0	Na 1000 ml bylo potřeba 3,02 g Tris (čistý) a 75 g PEG kontrolovat pH
LH standard (NIDDK-rLH-RP-3)	1 ml $\text{H}_2\text{O}$ – 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ v 1% BSA ve fosfátovém pufru = 5000 ng/ml	Aliquoty po 100 $\mu\text{l}$ byly skladovány při $-70^\circ\text{C}$
		Pracovní aliquoty s koncentrací 100 ng/10 $\mu\text{l}$

„ <sup>125</sup> I – LH tracer“ = značený antigen	připraven jodací		
Primární protilátka Ab (NIDDK-rLH- RP-I-8)	Dodaná lyofilizovaná protilátka LH byla ředěna do 1 ml pracovního pufru = 1:40; „rozpipetována“ po 20 µl a uchovávána při – 80°C	Před použitím bylo 20 µl 1:40 ředěno do 2 ml pracovního pufru LH = 1:4000; uchovávána při 4 – 8 °C v lednici přibližně 14 - 21 dní	Těsně před použitím ředíme na pracovní ředění cca 1:160 000
Sekundární protilátka Ab	Dodaná lyofilizovaná II. protilátka LH (Bachem) byla ředěna 50 ml základního pufru	„Rozpipetovat“, zmrazit a skladovat při – 20°C	

### 3.3.2.1 Příprava roztoků pro stanovení LH v den experimentu

Příprava standardů LH: První standard s hmotnostní koncentrací 10 ng/50 µl byl připraven smícháním 10 µl standardu LH a 490 µl M 199. Dále se pokračovalo v poměru 1:1, tedy 250 µl prvního standardu (10 ng/50 µl) a 250 µl M 199, tím vznikl druhý standard s hmotnostní koncentrací 5 ng/50 µl. Pokračovalo se geometrickou řadou až po osmý standard s hmotnostní koncentrací 0,08 ng/50 µl. Vznikla řada standardů s hmotnostními koncentracemi 10 – 5 – 2,5 – 1,2 – 0,6 – 0,3 – 0,16 – 0,08 ng/50 µl.

Příprava primární protilátky Ab: Přímě k měření je potřebná primární protilátka s pracovním ředěním 1:160 000. Na její přípravu bylo použito 0,6 ml primární protilátky s ředěním 1:4000 a 25 ml pracovního fosfátového pufru.

Značený antigen – „<sup>125</sup>I – LH tracer“ pracovní: Před měřením je potřebné zjistit jeho počet impulzů za minutu, přičemž ideální hodnoty jsou 10 000 – 15 000 cpm/50 µl.

Sekundární protilátka Ab: Podle potřeby byla připravena sekundární protilátka s pracovním ředěním 1:4 – 1:10. Byla ředěna základním fosfátovým pufrům (bez NRS).

### 3.3.3 Postup měření RIA

Hypofyzární buňky pro RIA-měření byly přes noc inkubovány v destičkách s 24 jamkami, v každé jamce bylo asi 150 000 buněk a 400 µl inbubačního roztoku M199 se sérem. Druhý den po izolaci bylo médium nad buňkami vyměněno za 360 µl čerstvého inbubačního roztoku M199 se sérem a přidáno 40 µl testované látky rozpuštěné v extracelulárním roztoku bez séra, celkový objem roztoku se tak nezměnil. Tři hodiny po

inkubaci byl roztok nad buňkami odebrán, zamražen a další den z něj byly odebírány 50  $\mu$ l vzorky pro stanovení sekrece LH.

Metodika samotného měření RIA byla rozdělena do dvou dnů.

### 1.den:

Nejdřív jsem do zkumavek pipetovala roztoky podle tabulky č. 8:

**Tabulka č. 8: Pracovní tabulka pro RIA-měření sekrece LH.** Množství přidávaných roztoků jsou uváděny v  $\mu$ l.

	pracovní pufr	M 199	standard	vzorek	$^{125}\text{I-LH}$	primární Ab
<b>total</b>	-	-	-	-	50	-
<b>blank</b>	100	50	-	-	50	-
<b>B<sub>0</sub></b>	-	50	-	-	50	100
<b>kalibrace</b>	-	-	50	-	50	100
<b>vzorek</b>	-	-	-	50	50	100

První zkumavku tvořil „total“, tedy jenom 50  $\mu$ l značeného antigenu – „ $^{125}\text{I}$  LH traceru“. Ještě před pipetováním byla měřena jeho radioaktivita v jednotkách cpm (= počet impulsů za minutu, „counts per minute“). Ideálně by se měla pohybovat v rozmezí 10 000 – 15 000 cpm/50  $\mu$ l. Pomocí ní je pak možné zjistit vazebnost příslušné vzorky, která by měla být v rozmezí 52 % - 20 %. Všechny analýzy byly prováděny v „tripletech“, v případě vzorků obsahujících stanovovanou látku, v „dupletech“. První trojice zkumavek byla nespecifická – „blank“, který obsahoval 100  $\mu$ l pracovního pufru, 50  $\mu$ l pufru M 199 a 50  $\mu$ l značeného antigenu. Další trojice obsahovala 50  $\mu$ l pufru M199, 50  $\mu$ l značeného antigenu, ale již také 100  $\mu$ l primární protilátky a byla označena jako „B<sub>0</sub>“. Pak následovala série kalibračních vzorků, taky ve „tripletech“, obsahující 50  $\mu$ l standardu LH (v geometrickém pořadí od 0,08 ng/50  $\mu$ l po 10 ng/50  $\mu$ l), 50  $\mu$ l značeného antigenu a 100  $\mu$ l primární protilátky. A konečně následovali samotné vzorky so stanovovanou látkou o objemu 50  $\mu$ l, měření prováděno v „dupletu“. Ke každému vzorku bylo přidáno 50  $\mu$ l značeného antigenu a 100  $\mu$ l primární protilátky.

Po pipetování byly všechny zkumavky promíchány na „vortexu“ a inkubovány při pokojové teplotě 20 -24 hodin.



## 2. den:

Po inkubaci bylo do každé zkumavky kromě „totálu“ přidáno 50 µl sekundární protilátky, která byla podle potřeby ředena základním fosfátovým pufrém (bez NRS) v poměru 1:4 – 1:10. Pak byly roztoky promíchány na „vortexu“ a inkubovány 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo do každé zkumavky přidáno 0,5 ml 7,5 % PEG v Tris pufru. Roztoky byly promíchány a následně centrifugovány 30 minut při 3700 ot./min. a 4 °C. Pak se supernatant opatrně odsál a sediment byl měřen 2 min. pomocí „Gamma counteru“.

### 3.3.4 Vyhodnocení metody RIA

Nejdřív bylo potřebné vytvořit kalibrační křivku pomocí standardních roztoků LH o známé hmotnostní koncentraci 10 – 5 – 2,5 – 1,2 – 0,6 – 0,3 – 0,16 – 0,08 ng/50 µl. Byla změřena jejich radioaktivita (počet impulsů) v jednotkách cpm. Dále bylo potřebné zjistit také radioaktivitu „blanku“ (neobsahuje primární protilátku) a roztoku B<sub>0</sub> (obsahuje primární protilátku). K vlastnímu vytvoření kalibrační křivky byla použita křivka „logit-log“, která vede k linearizaci kalibračního vztahu. Y-osa je potom definována vztahem

$$\text{logit } B/B_0 = \log_e (B/B_0)/(1-B/B_0)) \text{ nebo } \ln (B/B_0)/(1-B/B_0))$$

kde B bylo rovné hodnotě impulsů standardu LH (resp. vzorku LH), od které byla odčítaná hodnota impulsů „blanku“; a B<sub>0</sub> bylo rovné hodnotě impulsů roztoku B<sub>0</sub>, od které byla odčítaná hodnota impulsů „blanku“; tedy B = standard (vzorek) – blank; B<sub>0</sub> = B<sub>0</sub> – blank.

Pomocí tohoto vztahu a programu Excel byla vytvořena kalibrační křivka.

Touto metodou jsem se pokusila sledovat účinek ATP na sekreci LH, a to na bazální sekreci LH a GnRH-stimulovanou sekreci LH. Proto byly k měření použité roztoky obsahující samotné GnRH, samotný ATPγS, což je nehydrolyzovatelný analog ATP, který stimuluje receptory P2X a roztoky obsahující jejich směs, tedy GnRH + ATPγS a také základní kontrolní roztok, ve kterém bylo množství LH na bazální hladině.

K vyhodnocení těchto vzorků bylo také potřebné zjistit jejich radioaktivitu (počet impulsů), vypočítat „logit“ B/B<sub>0</sub> a pomocí kalibrační křivky stanovit množství LH ve vzorku. Protože byl při měření používán objem 50 µl vzorku, bylo ještě potřebné propočítat množství LH na celkové množství LH („LH total“) v jedné misce se vzorkem, který byl 400 µl. Následně byly tyto hodnoty vloženy do sloupcového grafu.

### **3.4 Statistická analýza**

Statistické vyhodnocení obou metod jsem prováděla v programu Excel 2007 pomocí popisní statistiky v programu analýzy dat. Chybové úsečky v grafech a statistické údaje v textu jsou uváděny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Statisticky významně odlišné hodnoty byly vyhodnoceny Studentovým t-testem na úrovni významnosti 95 % ( $p < 0,05$ ).

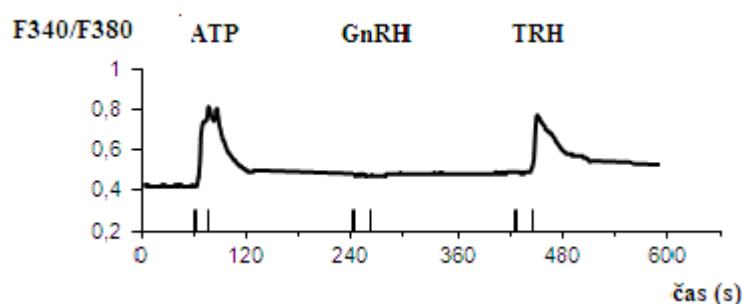
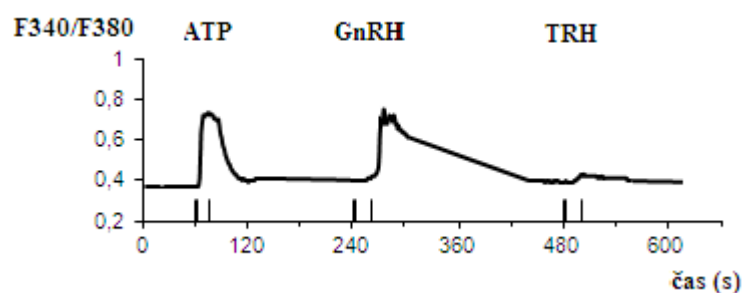
## 4 Výsledky

Měřením intenzity fluorescence  $\text{Ca}^{2+}$ -citlivé sondy Fura-2 byly studovány reakce smíšené populace neonatálních hypofyzárních buněk na extracelulární aplikaci ATP a citlivost identifikovaných gonadotropních (GnRH-citlivých buněk) a laktotropních + tyreotropních (TRH-citlivých) buněk na aplikaci ATP. Dále bylo provedeno srovnání ATP-odpovědí s reakcemi na různé agonisty ATP a rozdíl v citlivosti GnRH- a TRH-citlivých buněk k ATP a ADP. Zkoumán byl také vliv inhibitorů receptorů P2X na ATP-odpověď u různých typů hypofyzárních buněk. Nakonec byl pomocí metody RIA sledován účinek ATP na sekreci LH.

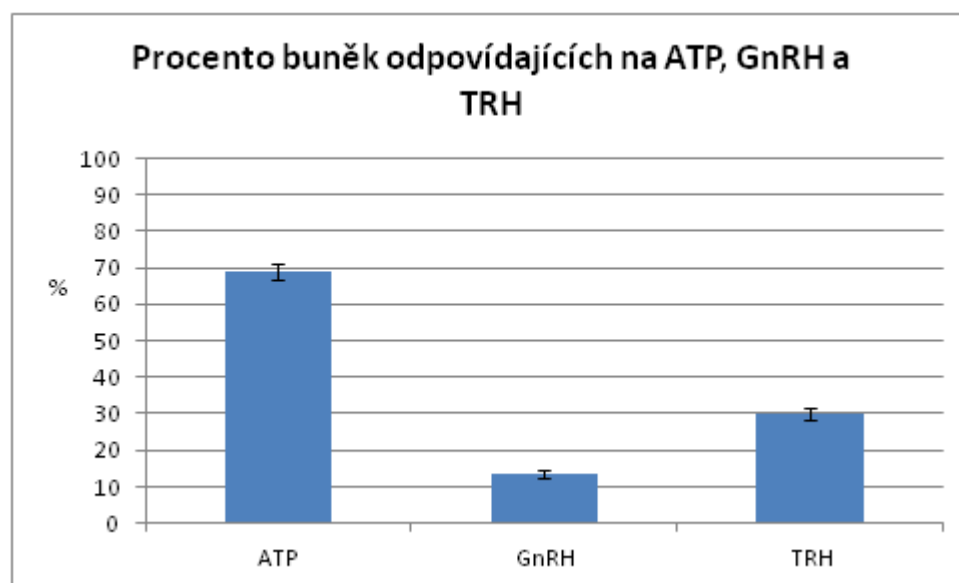
### 4.1 Citlivost buněk neonatální adenohipofýzy k ATP, GnRH a TRH

V této části pokusů bylo provedeno 86 měření (jedno měření odpovídá sklíčku s buněčnou kulturou), ve kterých bylo celkem měřeno 643 buněk. Typické reakce buněk na aplikaci ATP, GnRH a TRH jsou zobrazeny na obr. 15 A. Aplikace ATP (100  $\mu\text{M}$ ) po dobu 10 - 15 s vyvolala u 444 buněk, tedy u 69,1 % ze všech buněk, zvýšení hladiny  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Obr. 15 A). Hladina intracelulárních iontů  $\text{Ca}^{2+}$  dosáhla maxima během prvních 5 s od začátku aplikace ATP a na klidovou hladinu  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se vrátila průměrně během 50 - 60 s. Z celkového počtu buněk odpovídalo na 20 s aplikaci GnRH (1 nM) zvýšením hladiny  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  celkem 87 buněk, což znamená, že 13,5 % ze všech buněk tvořily gonadotropy (Obr. 15 B). V tomto případě hladina  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dosáhla oscilujícího maxima průměrně po 30 s od začátku aplikace GnRH a na klidovou hladinu  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se vracela pozvolna, až ji dosáhla po 2 - 2,5 minutách. Na aplikaci TRH (100 nM), která trvala také 20 s, odpovídalo zvýšením hladiny  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  z celkového množství buněk celkem 193 buněk, což prokazuje, že 30,0 % buněk v kultuře tvoří laktotropy a tyreotropy (Obr. 15 B). Hladina  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  v tomto případě dosáhla neoscilujícího maxima průměrně po 20 s od začátku aplikace TRH (Obr. 15 A), na klidovou hladinu  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se vrátila oproti buňkám GnRH mnohem rychleji, a to po 1 - 1,5 minutách. Tyto pokusy ukázaly, že celkový počet buněk citlivých k ATP v neonatální hypofýze je vyšší než je součet GnRH- a TRH-citlivých buněk (Obr. 15 B). To znamená, že také jiné buněčné podtypy (somatotropy nebo kortikotropy) nesou purinergní receptory.

**A**



**B**

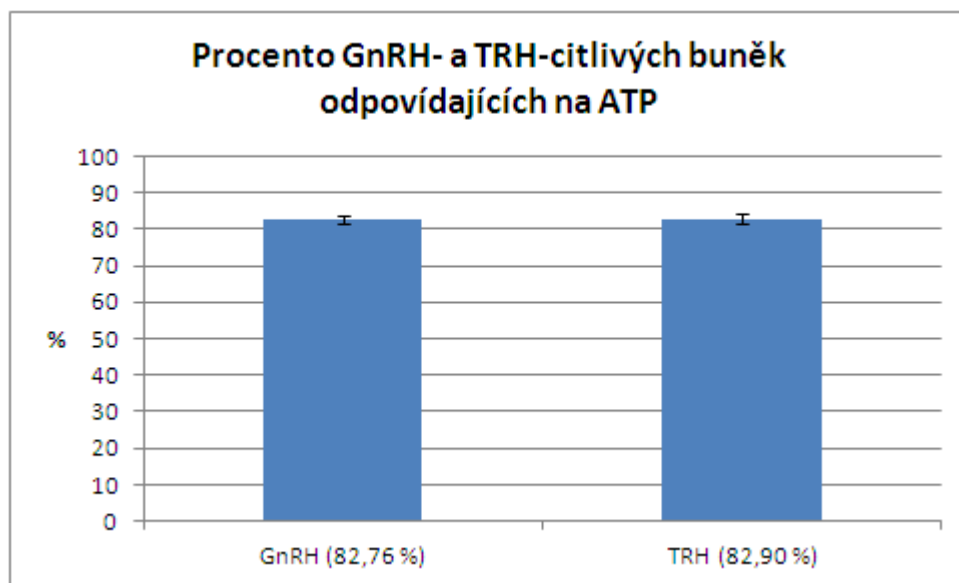


**Obrázek č. 15: Zastoupení buněk odpovídajících na ATP, GnRH a TRH ve směsné populaci neonatálních hypofyzárních buněk potkana. (A)** Ukázky průběhu změn hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  zaznamenané jako poměr F340/380 po aplikaci ATP, GnRH a TRH. Jak TRH-citlivé buňky, tak i GnRH-citlivé buňky reagovaly na ATP. **(B)** Procento ATP-citlivých buněk (ATP), a procento GnRH-citlivých buněk (GnRH) a TRH-citlivých buněk, t.j. laktotropů + tyreotropů (TRH) ve směsné populaci neonatálních hypofyzárních buněk složené z laktotropů, gonadotropů,

kortikotropů, somatotropů a tyreotropů. Z celkového počtu 643 buněk reagovalo na ATP 444 buněk, na GnRH 87 buněk a na TRH 193 buněk. Hodnoty jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka z 86 měření.

#### 4.2 Citlivost GnRH- a TRH-citlivých buněk k ATP

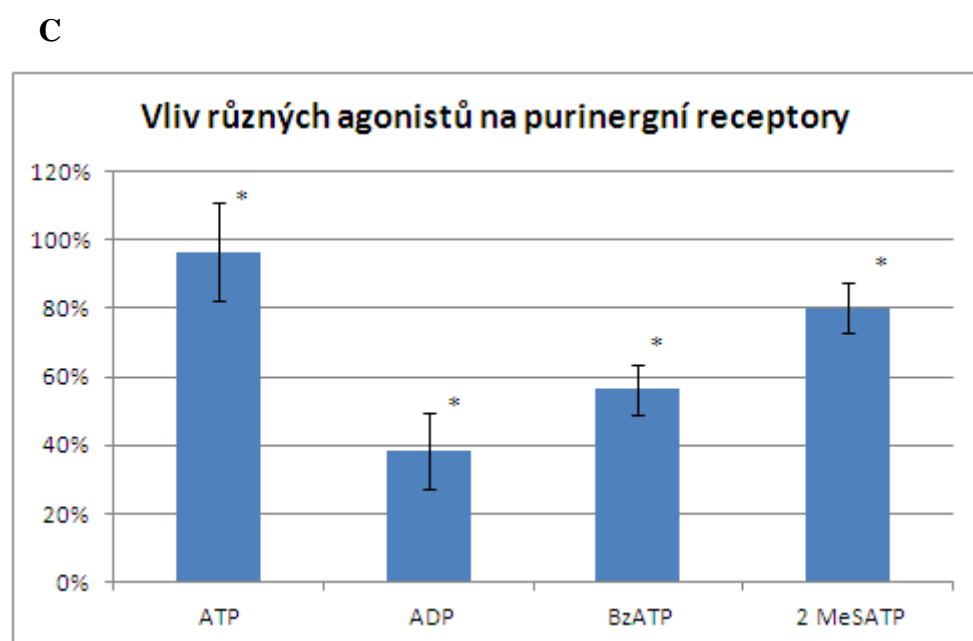
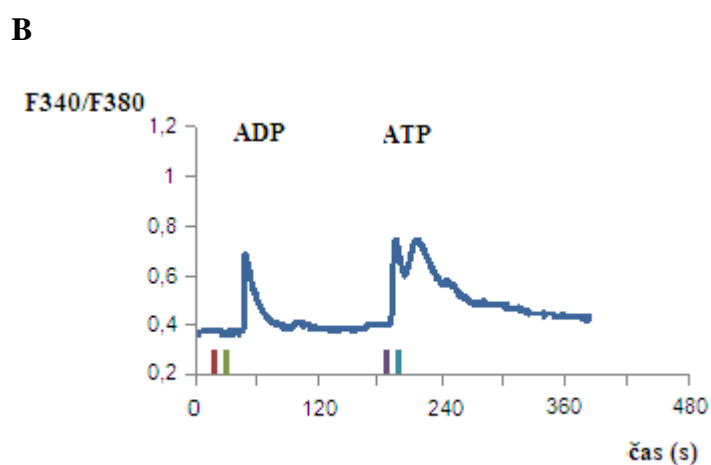
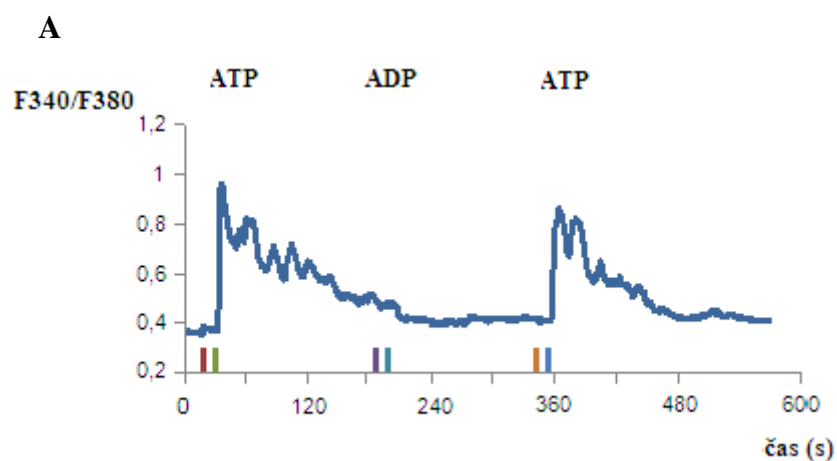
V této části práce jsem se pokusila zjistit, kolik procent ze všech GnRH- a TRH-citlivých buněk bylo sensitivních k ATP. Celkový počet GnRH-citlivých buněk byl 87, přičemž z nich odpovídalo na ATP zvýšením hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  celkem 72 buněk, (82,76 %). Celkový počet TRH-citlivých buněk, tedy tyreotropů a laktotropů byl 193. Z těchto buněk na ATP odpovídalo zvýšením koncentrace intracelulárních iontů vápníku 160 buněk, což je 82,90 %. U obou typů buněk je tedy stejné procento buněk citlivých k ATP a toto procento je vysoké (Obr. 16).



**Obrázek č. 16: Procento GnRH- a TRH-citlivých buněk odpovídajících na ATP.** Sloupcový graf ukazuje zastoupení ATP-citlivých buněk v subpopulaci neonatálních gonadotropních buněk (GnRH) a v subpopulaci složené z laktotropů a tyreotropů (TRH). Z celkového počtu 87 GnRH-citlivých buněk reagovalo na ATP celkem 72 buněk a z celkového počtu 193 TRH-citlivých buněk reagovalo na ATP 160 buněk. Hodnoty jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka z 86 měření.

### **4.3 Porovnání citlivosti smíšené populace neonatálních hypofyzárních buněk na aplikaci ATP a dalších agonistů purinergních receptorů**

V těchto pokusech byly na smíšenou populaci neidentifikovaných hypofyzárních buněk postupně aplikovány kromě ATP také jiní agonisté purinergních receptorů, a to konkrétně ADP (100  $\mu$ M), BzATP (100  $\mu$ M) a 2 MeSATP (100  $\mu$ M). Celkem bylo provedeno 53 měření a sledováno bylo 233 buněk. Z celkového počtu měření připadalo na aplikaci ADP 39 měření na 194 buňkách, 9 měření na 18 buňkách připadalo na aplikaci BzATP a nakonec na aplikaci 2 MeSATP připadalo 5 měření na 21 buňkách. Pokusy byly prováděny v předem definovaném pořadí tří aplikací tak, že jako první byl aplikován ATP po dobu přibližně 15 s, po poklesu hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  na základní hladinu, tedy asi po 2,5 min byl aplikován testovaný agonista po dobu přibližně 20 s a po uběhnutí asi 2,5 min byl nakonec aplikován po dobu 15 s opět ATP (Obr. 17 A). Hladina  $[Ca^{2+}]_i$  po druhé aplikaci ATP poklesla průměrně přibližně o 3 % oproti hodnotě při první aplikaci ATP. Průměr těchto dvou hodnot představoval kontrolu pro srovnání odpovědi po přidání různých agonistů. Další pokusy byly prováděny v předem definovaném pořadí dvou aplikací tak, že jako první byl aplikován konkrétní agonista (napr. ADP, Obr. 17 B) po dobu přibližně 20 s, po uběhnutí asi 2,5 min a poklesu hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  na základní hladinu následován aplikací ATP po dobu přibližně 15 s. Výsledky získané použitím obou protokolů byly shodné. Celková citlivost neonatálních hypofyzárních buněk k jiným agonistům byla menší než k ATP a byla snížena v pořadí ATP > 2 MeSATP > BzATP > ADP (Obr. 17 C). V případě druhé aplikace ATP dosáhla hladina  $[Ca^{2+}]_i$   $96,55 \pm 14,3$  % z hodnoty první aplikace ATP, která představovala 100 %. V případě 2 MeSATP dosáhla hladina  $[Ca^{2+}]_i$   $80,14 \pm 7,3$  %, po aplikaci BzATP  $56,28 \pm 7,4$  % a po aplikaci ADP  $38,31 \pm 10,9$  % hodnoty odpovědi na ATP. Tyto pokusy ukázaly, že ve smíšené populaci neonatálních hypofyzárních buněk se vyskytují purinergní receptory P2X citlivé na ATP, receptory P2X<sub>7</sub> citlivé na BzATP a také receptory P2Y citlivé k ADP.



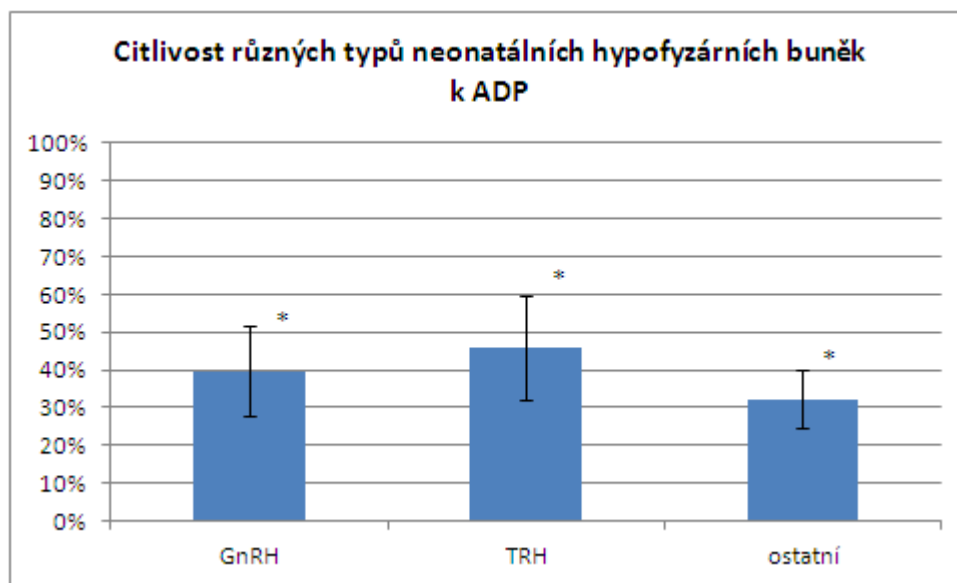
**Obrázek č. 17: Citlivost neonatálních hypofyzárních buněk k ATP a ostatním agonistům purinergních receptorů. (A) Ukázka průběhu změn koncentrace intracelulárních iontů  $\text{Ca}^{2+}$  po**

první aplikaci ATP a ADP. Je vidět malá odpověď na ADP a přibližně 3 % pokles hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  po přidání ATP ve srovnání s předchozí aplikací. **(B)** Ukázka průběhu změn koncentrace intracelulárních iontů  $Ca^{2+}$  po přidání ADP, na který buňka zareagovala stejně jako na ATP. **(C)** Sloupcový graf ukazující rozdíl v účinnosti různých agonistů purinergních receptorů (ATP, ADP, BzATP a 2 MeSATP) na vzrůst hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  ve smíšené populaci hypofyzárních buněk. 100 % odpovídá amplitudě odpovědi na první aplikaci ATP. Hodnoty jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka z celkem 53 měření, přičemž na aplikaci ADP připadalo 39 měření, na aplikaci BzATP 9 měření a na aplikaci 2 MeSATP 5 měření; \*označuje statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4 Rozdíl mezi TRH- a GnRH-citlivými buňkami v jejich reakci na aplikaci ADP**

V další sérii pokusů jsem zjišťovala, jak se GnRH- a TRH-citlivé buňky liší v zastoupení jejich odpovědí na ADP, tedy v odpovědích, které jsou typické pro receptory P2Y. Celkem bylo provedeno 39 měření za použití 194 buněk. Z nich odpovídalo na aplikaci GnRH zvýšením hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  39 buněk a na aplikaci TRH 58 buněk. Z 39 buněk, které odpovídaly na GnRH, odpovídalo na aplikaci ADP zvýšením hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  18 buněk, což je 46,2 %. Na aplikaci ADP ze všech buněk, které byly citlivé na TRH, odpovídalo 34 buněk, což je 58,6 %. Ze zbylých 97 buněk, které patří k zatím neidentifikovaným hypofyzárním buňkám, odpovídalo na aplikaci ADP 40 buněk, což je 41,2 %. Amplituda odpovědí na ADP byla nejvyšší u TRH-citlivých buněk, kde dosáhla hladina  $[Ca^{2+}]_i$   $45,79 \pm 13,6$  % z hodnoty po přidání ATP, u GnRH-citlivých buněk dosáhla  $39,68 \pm 12$  %, a u ostatních buněk  $32,19 \pm 7,7$  % (Obr. 18). Z těchto výsledků je zřejmé, že citlivost k ADP je vyšší u TRH-citlivých buněk než u GnRH-citlivých buněk a ostatních typů hypofyzárních buněk, a tedy že receptory P2Y jsou nejvíce exprimovány na TRH-citlivých buňkách.





**Obrázek č. 18: Citlivost různých typů hypofyzárních buněk k ADP.** Změny amplitudy hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  (%) byly měřeny po aplikaci ATP a ADP, přičemž ATP byl aplikován před (100 %) i po aplikaci ADP. Měření byla prováděna na GnRH-citlivých buňkách (GnRH), kterých bylo celkem 39 buněk, TRH-citlivých buňkách (TRH), kterých bylo 58 buněk a ostatních, GnRH- a TRH-necitlivých, buňkách (ostatní), kterých bylo celkem 97 buněk. Celkem bylo použito k měření 194 buněk. Hodnoty jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka z 39 měření; \*označuje statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

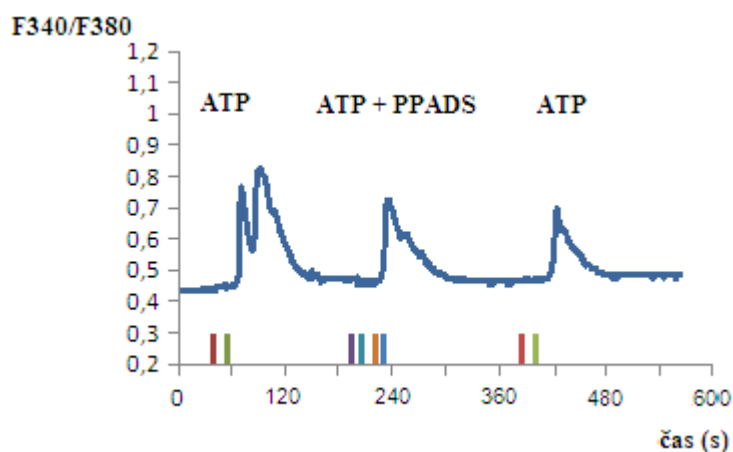
#### 4.5 Vliv inhibitorů receptorů P2X na hladinu $[Ca^{2+}]_i$ zvýšenou po aplikaci ATP v neonatálních hypofyzárních buňkách

Pro zjištění vlivu inhibitorů na hladinu  $[Ca^{2+}]_i$  zvýšenou po aplikaci ATP jsem použila dva typy inhibitorů. PPADS je obecný inhibitor receptorů P2X, citlivé jsou k němu především receptory P2X<sub>2</sub>, zatímco receptory P2X<sub>4</sub> jsou málo citlivé. BDBD je naopak specifický inhibitor receptorů P2X<sub>4</sub>. V pokusech jsem se zaměřila především na inhibitor BDBD, protože se jedná o nového antagonistu, jehož působení ještě nebylo důkladně experimentálně prozkoumáno. Pokusy jsem provedla během 14 měření, a to na 75 buňkách ve smíšené populaci neonatálních hypofyzárních buněk. Z tohoto množství připadalo na aplikaci BDBD (10  $\mu$ M) 12 měření na 69 buňkách (ukázka není přiložena) a 2 měření pro PPADS (10  $\mu$ M) na 6 buňkách (Obr. 19 A). Změny  $[Ca^{2+}]_i$  jsem měřila po postupném přidání ATP jako první kontroly, ATP + BDBD resp. PPADS a nakonec ATP jako druhé

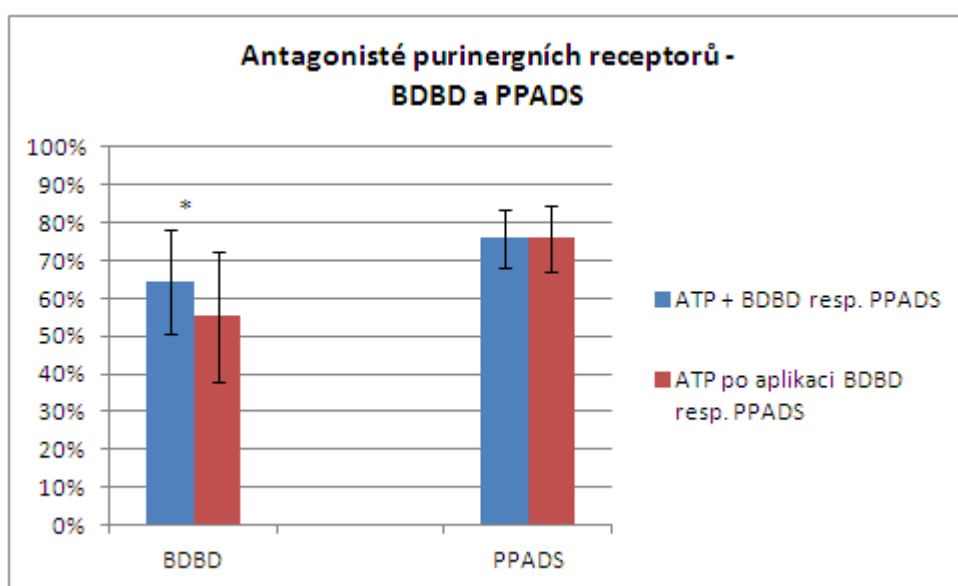
kontroly. V obou případech však inhibiční účinek obou antagonistů nebylo možné odstranit během času určenému k experimentu, navíc v případě BDBD účinek pokračoval i po jeho odstanění z média. Jako kontrolní hodnota proto byla použita pouze první aplikace ATP. Při použití této jediné kontroly jsem našla inhibiční účinek obou inhibitorů na ATP-stimulované  $[Ca^{2+}]_i$  odpovědi, který byl v přítomnosti BDBD 44,8 % a v přítomnosti PPADS jenom 24,1 %, protože pokles  $[Ca^{2+}]_i$  byl v případě aplikace BDBD na hodnotu  $55,2 \pm 17,2$  % oproti hladině  $[Ca^{2+}]_i$  po aplikaci ATP a v případě aplikace PPADS na hodnotu  $75,9 \pm 8,9$  % (Obr. 19 B).

V těchto pokusech jsem ověřila, že neonatální hypofyzární buňky, včetně GnRH- a TRH-citlivých buněk, obsahují receptory P2X<sub>2</sub> a P2X<sub>4</sub>, ale pravděpodobně jsou víc exprimovány receptory P2X<sub>4</sub>, protože účinek BDBD byl výraznější.

**A**



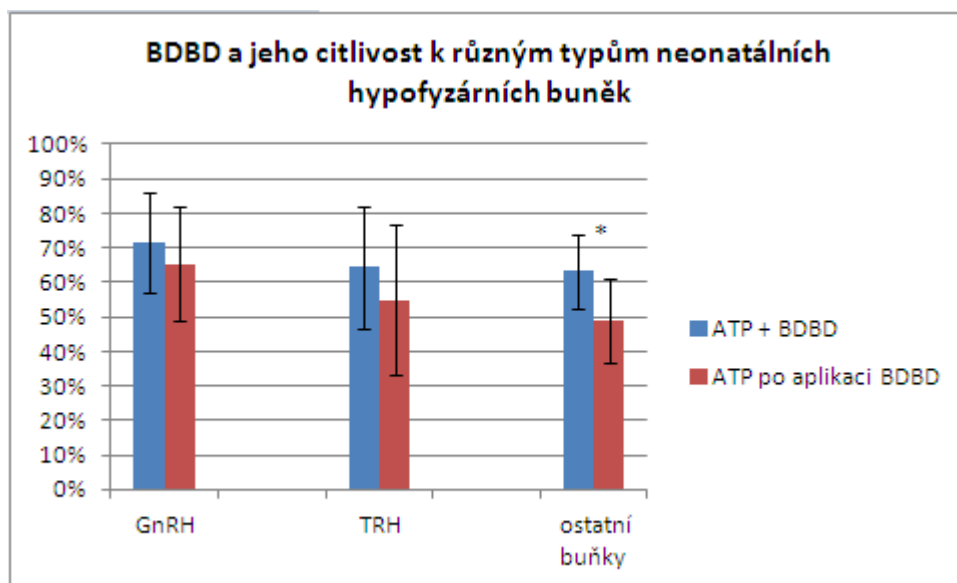
**B**



**Obrázek č. 19: Vliv antagonistů receptorů P2X - BDBD a PPADS na změny  $[Ca^{2+}]_i$  stimulované ATP.** (A) Ukázka průběhu změn hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  po postupném přidání ATP jako první kontroly, ATP + PPADS a nakonec ATP jako druhé kontroly. Je vidět pokles v hladině  $[Ca^{2+}]_i$  po přidání inhibitoru, ale také „rundown“, t.j. samovolný pokles hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  po aplikaci ATP. (B) Sloupcový graf ukazující inhibiční účinek antagonistů purinergních receptorů (BDBD a PPADS) na pokles hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  ve smíšené populaci neonatálních hypofyzárních buněk při společné aplikaci ATP a inhibitorů (modré sloupce) a přetrvávající inhibici po odstranění inhibitorů (červené sloupce). ATP aplikován jako první kontrola je 100 %. K měření bylo použito celkem 75 buněk, ze kterých připadalo pro aplikaci BDBD 69 buněk a 6 buněk pro aplikaci PPADS. Hodnoty jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka z celkem 14 měření, přičemž na aplikaci BDBD připadalo 12 měření a na aplikaci PPADS 2 měření; \*označuje statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6 Rozdíl mezi TRH- a GnRH-citlivými buňkami v jejich citlivosti k BDBD

Při tomto pokusu bylo provedeno 12 měření na celkem 69 buňkách. Zjišťovali jsme jak se GnRH- a TRH-citlivé buňky liší v jejich zastoupení při inhibici pomocí BDBD. Z 69 buněk, kterým byl aplikován BDBD odpovídalo na aplikaci GnRH zvýšením hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  14 buněk, což odpovídá 20,3 % gonadotropů. Na aplikaci TRH ze všech buněk, kterým byl aplikován BDBD, odpovídalo 21 buněk, což odpovídá 30,4 % populace laktotropních + tyreotropních buněk. Zbýlé buňky patřily k zatím neidentifikovaným hypofyzárním buňkám. Z grafu (Obr. 20) je vidět, že pokles hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  byl v případě GnRH-citlivých buněk na hodnotu  $65,37 \pm 16,6$  % oproti hladině  $[Ca^{2+}]_i$  po první aplikaci ATP, v případě TRH byl tento pokles na hodnotu  $54,97 \pm 21,8$  % a v případě ostatních nespecifikovaných buněk na hodnotu  $48,94 \pm 12,2$  %. Nejvyšší citlivost k BDBD mají tedy nespecifikované buňky, protože relativní pokles odpovědi  $[Ca^{2+}]_i$  v přítomnosti tohoto antagonisty byl největší (51,1 %). Pak následují TRH-citlivé buňky, kde tento pokles byl menší (45,0 %) a nejmenší citlivost k BDBD mají GnRH-citlivé buňky, přičemž relativní pokles odpovědi  $[Ca^{2+}]_i$  v přítomnosti BDBD byl nejmenší (34,6 %). Z těchto výsledků vyplývá, že pravděpodobně nejméně jsou receptory P2X<sub>4</sub> exprimovány na GnRH-citlivých buňkách a TRH-citlivých buňkách a relativně víc jsou exprimovány na zatím nespecifikovaných buňkách.

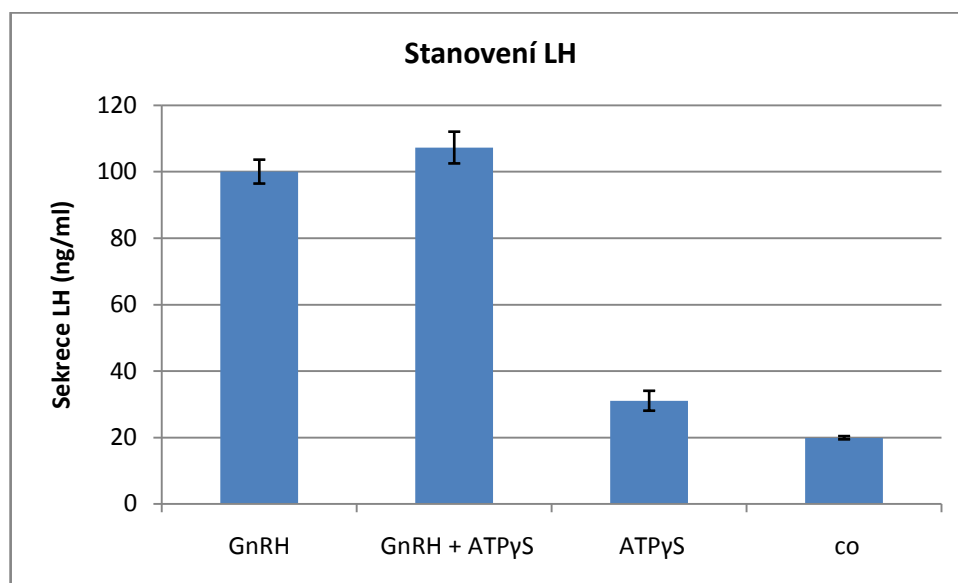


**Obrázek č. 20: Citlivost GnRH-citlivých a TRH-citlivých buněk k BDBD.** Změny amplitudy hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  (%) byly měřeny po aplikaci ATP a ATP + BDBD, přičemž ATP byl aplikován před (100 %) i po aplikaci ATP + BDBD. Měření byla prováděna na 14 buňkách citlivých k GnRH (GnRH), na 21 buňkách citlivých k TRH (TRH) a na ostatních GnRH- a TRH-necitlivých buňkách (ostatní), kterých bylo celkem 34 buněk. Celkem bylo k měření použito 69 buněk. Hodnoty jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka z 12 měření; \*označuje statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7 Účinek ATP na sekreci LH

Pokusy, ve kterých jsem sledovala vliv ATP na sekreci LH, byly provedeny pomocí metody RIA. Celkem byly provedeny 3 pokusy. Testovala jsem roztoky obsahující GnRH (3 nM), ATP $\gamma$ S (10  $\mu$ M), což je nehydrolyzovatelný analog ATP, který stimuluje receptory P2X, dále jsem používala také roztoky obsahující jejich směs, tedy GnRH + ATP $\gamma$ S. Jako kontrola bylo použito médium, které se používalo k ředění testovaných látek. Celkový objem jednoho vzorku byl 400  $\mu$ l, z tohoto objemu připadalo na základní médium 360  $\mu$ l. Protože k měření jsem přímo používala jenom 50  $\mu$ l vzorku, byly výsledky propočítány na objem 400  $\mu$ l a až pak zaznamenány do následujících sloupcových grafů. Vzorky byly pipetovány pro přesnější měření vždy v „dupletech“, proto z obou hodnot radioaktivity byl pomocí programu Excel udělán průměr a následně pomocí kalibrační křivky bylo vypočítáno množství LH ve vzorku.

Souhrn výsledků ze všech tří měření je uveden na obr. č. 21. Ve vzorcích obsahujících GnRH bylo průměrně  $18,95 \pm 0,73$  ng LH, což jsme určili jako 100 %. Ve zkumavkách obsahujících směs GnRH + ATP $\gamma$ S bylo průměrně  $20,32 \pm 0,93$  ng LH, což odpovídá 107,24 %. Ve zkumavkách obsahujících samotný ATP $\gamma$ S bylo průměrně  $5,88 \pm 0,55$  ng LH, což odpovídá 31,03 %. V případě kontroly bylo zjištěno průměrné množství LH  $3,77 \pm 0,10$  ng, což odpovídá 19,89 %.



**Obrázek č. 21: Vliv ATP $\gamma$ S na bazální a GnRH-stimulovanou sekreci luteinizačního hormonu (LH) v kultuře izolovaných hypofyzárních buněk.** GnRH-stimulovaná sekrece LH byla navýšena při společné aplikaci s ATP $\gamma$ S, a samotný ATP $\gamma$ S stimuloval sekreci v nepřítomnosti GnRH. Uvolňování LH do média bylo stanoveno metodou RIA, každá hodnota představuje průměr ze 3 různých měření, v každém měření bylo stanovení prováděno v 6 vzorcích pro každou testovanou látku. Hodnoty jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka z těchto stanovení.

## 5 Diskuse

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem purinerní signalizace v neonatálních hypofyzárních buňkách potkanů. Pomocí série mikrofluorimetrických měření intenzity fluorescence  $\text{Ca}^{2+}$ -citlivé sondy Fura-2 jsem měřila změny  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  vyvolané aplikací extracelulárního ATP, ADP a jim podobných nukleotidů, a zjišťovala jsem procento buněk odpovídajících na aplikaci GnRH a TRH ve směsné populaci neonatálních hypofyzárních buněk. Dále jsem porovnávala citlivost identifikovaných gonadotropních (GnRH-citlivých buněk) a laktotropních + tyreotropních (TRH-citlivých) buněk na aplikaci extracelulárního ATP. Ke zjištění výskytu ionotropních nebo metabotropních typů purinerních receptorů P2 v populaci neonatálních buněk přední hypofýzy jsem porovnávala citlivost smíšené populace buněk k různým typům agonistů purinerních receptorů, konkrétně citlivost k ATP, ADP, BzATP a 2 MeSATP. Na identifikovaných gonadotropních buňkách a tyreotropních + laktotropních buňkách jsem zjistila a porovnávala přítomnost receptorů P2Y zkoumáním jejich citlivosti k ADP. Vliv různých antagonistů purinerních receptorů P2X na přirozeně se vyskytující purinerní receptory v neonatální hypofýze je zatím jenom málo a nedostatečně objasněn. Proto jsem se také pokusila zjistit jaký vliv na hladinu  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  stimulovanou pomocí ATP mají specifické inhibitory receptorů P2X, PPADS a BDBD. Následně jsem na identifikovaných gonadotropních, tyreotropních a laktotropních buňkách porovnávala přítomnost receptorů P2X<sub>4</sub>, zkoumáním citlivosti ATP odpovědi k BDBD. Pro zjištění možného fyziologického významu extracelulárního ATP v neonatální hypofýze jsem sledovala jeho vliv na sekreci LH v kultuře izolovaných hypofyzárních buněk pomocí radioimunologického měření.

### 5.1 Neonatální hypofyzární buňky a jejich citlivost k ATP

Reakce buněk adenohypofýzy dospělých potkanů na aplikaci ATP a dalších purinerních agonistů a antagonistů je relativně dobře prozkoumána<sup>27, 35, 36, 39, 40</sup>. Extracelulární ATP zvyšuje intracelulární koncentraci iontů  $\text{Ca}^{2+}$  ve velkém procentu endokrinních buněk přední hypofýzy, v laktotropech, somatotropech a gonadotropech, a to vstupem extracelulárních iontů  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky (receptory P2X) nebo uvolněním jejich intracelulárních zásob (receptory P2Y)<sup>36</sup>. Aplikace extracelulárního ATP stimuluje a

urychluje uvolnění hormonů LH a FSH, ale také hormonů TSH a PRL v dospělých gonadotropech, tyreotropech a laktotropech hypofýzy<sup>27, 60</sup>. Chen a jeho spolupracovníci<sup>39</sup> použitím „real-time imaging Fura-2 fluorescence“ na úrovni jedné buňky ukázali, že ATP způsobuje rychlý vzrůst  $[Ca^{2+}]_i$  přibližně ve 30 % buněk adenohypofýzy dospělých potkanů v primární kultuře a jako jedny z cílových buněk pro účinek ATP identifikovali právě dospělé gonadotropy. Zároveň ukázali, že tyto reakce  $[Ca^{2+}]_i$  byly zprostředkovány receptory P2Y.

V dalších studiích byly k lepšímu porozumění výskytu receptorů P2X v buňkách přední hypofýzy dospělých potkanů využity techniky molekulární biologie kombinované s elektrofyziologií. Stojilkovic a spol. v těchto experimentech ukázali, že prakticky všechny gonadotropy a TRH-citlivé buňky exprimují funkční receptory P2X, a že sekreční buňky dospělé hypofýzy mají hojně exprimované především receptory P2X<sub>2</sub> a P2X<sub>4</sub>, a nízkou expresi dalších podjednotek<sup>43</sup>. Ionotropní receptory P2X se od metabotropních receptorů P2Y liší sensitivitou k ATP a reakční rychlostí. Receptory P2X jsou aktivovány mikromolárními koncentracemi ATP a reagují během milisekund, zatímco receptory P2Y odpovídají již na nanomolární koncentrace ATP a díky svému působení přes intracelulární  $Ca^{2+}$ - signální kaskádu prodlužují dobu trvání signálu až na stovky vteřin<sup>61</sup>. Endogenní koncentrace extracelulárního ATP dostačující k aktivaci všech typů receptorů P2X jsou v rozsahu 100-200  $\mu M$ <sup>41</sup>.

Ke zvýšení koncentrace intracelulárních iontů  $Ca^{2+}$  v neonatálních buňkách adenohypofýzy jsem ve svých pokusech používala 100  $\mu M$  ATP, tedy koncentraci dostačující k vyvolání reakce a k otevření purinergních receptorů P2X. Důkazem, že neonatální hypofyzární buňky obsahují purinergní receptory bylo, že ze všech buněk na extracelulární ATP reagovalo 69,1 % buněk. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky jiných autorů, kteří ve svých studiích na dospělé hypofýze uvádějí podobné procento buněk, ve kterých aplikace extracelulárního ATP spouští  $Ca^{2+}$ - signalizaci<sup>27, 39, 60</sup>.

Celkový počet ATP- citlivých buněk v neonatální hypofýze byl vyšší než součet GnRH- a TRH-citlivých buněk. Buněk obsahujících gonadotropy bylo 13,5 % a buněk obsahujících tyreotropy a laktotropy bylo 30,0 %. To znamená, že také jiné buněčné podtypy (somatotropy nebo kortikotropy) v neonatální hypofýze nesou purinergní receptory. Dále jsem zjistila, že ze všech GnRH- a TRH-citlivých buněk bylo citlivých k aplikaci extracelulárního ATP přibližně stejně vysoké procento těchto buněk. To

znamená, že asi 82 % gonadotropů, laktotropů a tyreotropů odpovídá na aplikaci ATP zvýšením  $[Ca^{2+}]_i$ . Nejnovější elektrofyzilogické studie na dospělé hypofýze však uvádějí vyšší procento, prakticky všechny gonadotropy (98 %) a TRH-citlivé buňky (92 %) odpovídají na aplikaci extracelulárního ATP membránovým proudem<sup>44, 62</sup>. Tento rozdíl v citlivosti k ATP může být způsoben tím, že neonatální buňky adenohypofýzy exprimují menší množství receptorů P2X (mRNA nebo proteinu) než hypofyzární buňky dospělých potkanů.

## **5.2 Rozlišení purinergních receptorů v různých typech buněk neonatální adenohypofýzy**

Molekulární identifikace receptorů P2X exprimovaných v buňkách přední hypofýzy byla objasněna pomocí analýzy RT-PCR za použití dospělých<sup>46</sup> potkaních buněk adenohypofýzy. Použitím specifických primerů receptorů P2X byly detekovány transkripty kódující receptory P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub> ve smíšených populacích buněk přední hypofýzy. Kromě těchto čtyř typů receptorů P2X a receptoru P2Y<sub>2</sub><sup>46</sup> He a spol.<sup>60</sup> ukázali, že přední hypofýza dospělých potkanů exprimuje také další čtyři typy receptorů P2Y, a to P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> a P2Y<sub>12</sub>. I Stojilkovic a spol.<sup>35</sup> využili specifické vlastnosti agonistů purinergních receptorů k hledání buněčně specifické exprese receptorů P2X mezi buňkami přední hypofýzy dospělých potkanů. Zjistili, že BzATP, agonista, který aktivuje receptory P2X<sub>7</sub> a P2X<sub>2</sub> vyvolal vzrůst koncentrace intracelulárních iontů  $Ca^{2+}$  v mnohých laktotropech, somatotropech a gonadotropech. Přibližně 75 % laktotropů reagovalo na BzATP s nedesenzitizující hladinou  $[Ca^{2+}]_i$ , která je typická především pro buňky exprimující P2X<sub>7</sub> a přidání ATP do již přítomného BzATP u nich nemělo žádný účinek. Naopak, v gonadotropech a somatotropech přidání ATP k již přítomnému BzATP zvýšilo  $[Ca^{2+}]_i$ , což naznačuje, že tyto buňky exprimují podjednotky receptorů P2X<sub>2</sub>. Tyto výsledky jsou v souladu s analýzou RT-PCR a potvrzují, že receptory P2X<sub>2</sub> jsou exprimovány v dospělých gonadotropech a somatotropech. Laktotropy nejpravděpodobněji exprimují funkční receptory P2Y<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> a P2X<sub>7</sub>. Zdá se, že kortikotropy neodpovídají na extracelulární ATP přímou stimulací žádného receptoru P2X a identifikace dalšího typu buněk přední hypofýzy, tyreotropů, zatím ještě není zcela objasněna. Transkripty pro receptory P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>5</sub> a P2X<sub>6</sub> nebyly přítomné ve směsi hypofyzárních buněk.



V mých pokusech byly na smíšenou populaci neidentifikovaných neonatálních hypofyzárních buněk postupně aplikovány kromě ATP také další agonisté purinergních receptorů, a to konkrétně ADP (100  $\mu$ M), BzATP (100  $\mu$ M) a 2 MeSATP (100  $\mu$ M). ADP je univerzální agonista receptorů P2Y, ATP a 2 MeSATP jsou univerzální agonisté receptorů P2X, BzATP je agonista aktivujících receptory P2X<sub>7</sub>. Zjistila jsem, že celková citlivost neonatálních hypofyzárních buněk k agonistům byla menší než k ATP a byla snížena v pořadí ATP > 2 MeSATP > BzATP > ADP. V případě 2 MeSATP dosáhla hladina  $[Ca^{2+}]_i$  80,14  $\pm$  7,3 % z hodnoty po přidání ATP, hodnota hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  po aplikaci BzATP byla 56,28  $\pm$  7,4 % z hodnoty po přidání ATP a hodnota této hladiny po aplikaci ADP byla jenom 38,31  $\pm$  10,9 % hodnoty odpovědi na ATP. Tyto pokusy ukázaly, že ve smíšené populaci neonatálních hypofyzárních buněk se vyskytují purinergní receptory P2X citlivé k ATP a 2 MeSATP, receptory P2X<sub>7</sub> citlivé k BzATP a také receptory P2Y citlivé k ADP. Zde se moje výsledky na neonatálních buňkách hypofýzy příliš neliší od výsledků studií prováděných s dospělými buňkami, protože ty říkají, že citlivost smíšené populace dospělých hypofyzárních buněk vůči různým agonistům je v pořadí 2 MeSATP > ATP > BzATP > ADP<sup>60</sup>. V obou případech je citlivost receptorů P2X nejnižší k ADP.

Dále jsem zjistila, jak se GnRH- a TRH-citlivé buňky liší v zastoupení jejich  $[Ca^{2+}]_i$  odpovědí na ADP, tedy v odpovědích, které jsou typické pro receptory P2Y. V případě všech buněk odpovídajících na ADP, amplituda  $[Ca^{2+}]_i$  dosahovala 32 - 46 % z amplitudy  $[Ca^{2+}]_i$  odpovídající na ATP, relativně nejvyšší (45,79  $\pm$  13,6 %) však byla u TRH-citlivých buněk. Z 39 buněk, které odpovídaly na GnRH, odpovídalo na aplikaci ADP zvýšením hladiny  $[Ca^{2+}]_i$  18 buněk, což je 46,2 %. Na aplikaci ADP ze všech buněk, které byly citlivé na TRH, odpovídalo 34 buněk, což je 58,6 %. Ze zbylých 97 buněk, které patří k zatím neidentifikovaným hypofyzárním buňkám, odpovídalo na aplikaci ADP 40 buněk, což je 41,2 %. Z těchto výsledků je zřejmé, že citlivost k ADP je vyšší u TRH-citlivých buněk než u GnRH-citlivých buněk, a tedy že receptory P2Y jsou více exprimovány v tyreotropech a laktotropech, než v gonadotropech. Tento závěr částečně odpovídá výsledkům studií ukazujících, že receptory P2Y se mohou nacházet v buňkách dospělé adenohypofýzy, kde například bylo zjištěno, že podjednotky P2Y<sub>2</sub> jsou lokalizovány v laktotropech a imortalizovaných buňkách GH<sub>3</sub>, ale nejsou přítomny v somatotropech a gonadotropech<sup>20, 35, 46</sup>. Z mých výsledků vyplývá, že neonatální gonadotropy, laktotropy a tyreotropy pravděpodobně obsahují receptory P2Y, což je v případě gonadotropů v rozporu

s literárně dostupnými údaji. K přesnému určení o jaký typ receptorů se jedná by ovšem bylo potřebné provést analýzu PCR, což jsem pro nedostatek času nemohla uskutečnit.

### **5.3 Vliv inhibitorů na purinergní receptory buněk neonatální hypofýzy**

Vliv různých antagonistů a inhibitorů purinergních receptorů na buněčnou populaci buněk adenohypofýzy je ještě méně prozkoumán než vliv agonistů. V mé práci jsem se zaměřila na dva inhibitory purinergních receptorů, a to pyridoxal-5'-fosfát-6-azofenyl-2',4'-disulfonát (PPADS) a 5-(3-bromfenyl)-1,3-dihydro-2H-benzofuro[3,2-e]-1,4-diazepin-2-on (BDBD). Bylo zjištěno, že PPADS je obecný inhibitor receptorů P2X, avšak citlivé jsou k němu především receptory P2X<sub>2</sub>, zatímco receptory P2X<sub>4</sub> jsou málo citlivé<sup>31</sup>. BDBD je naopak specifický inhibitor jenom receptorů P2X<sub>4</sub><sup>63</sup>. Zjistila jsem, že neonatální buňky hypofýzy reagovaly na oba dva inhibitory, proto je zřejmé, že tyto buňky exprimují receptory P2X<sub>2</sub> i receptory P2X<sub>4</sub>. Inhibiční účinek obou inhibitorů na ATP-stimulované odpovědi  $[Ca^{2+}]_i$  byl viditelný a v případě aplikace BDBD dosahoval 44,8 %, avšak v případě PPADS jenom 24,1 %. V pokusech s PPADS jsem zjistila, že GnRH- a TRH-citlivé buňky obsahují receptory P2X<sub>2</sub>, které jsou však přítomné i v nespecifikovaných buňkách. Na aplikaci BDBD odpovídalo zvýšením  $[Ca^{2+}]_i$  20,3 % gonadotropů a 30,4 % tyreotropů a laktotropů. Zbýlé procento buněk patřilo k zatím neidentifikovaným hypofyzárním buňkám. Nejvyšší citlivost k BDBD jsem zjistila v případě nespecifikovaných buněk, protože relativní pokles  $[Ca^{2+}]_i$  v přítomnosti tohoto antagonisty byl největší (51 %), pak následují TRH-citlivé buňky, kde tento pokles byl menší (45 %) a nejmenší citlivost k BDBD měly GnRH-citlivé buňky, přičemž relativní pokles  $[Ca^{2+}]_i$  v přítomnosti BDBD byl u nich jenom 34,6 %. Z těchto výsledků vyplývá, že pravděpodobně nejméně jsou receptory P2X<sub>4</sub> exprimovány na GnRH-citlivých buňkách a TRH-citlivých buňkách a relativně víc jsou exprimovány na zatím nespecifikovaných buňkách.

### **5.4 Stanovení LH metodou RIA**

Metoda RIA je založena na kompetitivní heterogenní imunochemické reakci, ve které značený antigen Ag\* soupeří o vazebná místa na protilátce Ab s neznačeným antigenem Ag. Stanovovaná látka, tedy LH byl v tomto případě neznačený antigen. Výsledkem reakce je vznik dvou komplexů: značený antigen - protilátka (Ag\*-Ab) a neznačený antigen - protilátka (Ag-Ab). Rovnovážné konstanty pro oba děje jsou shodné. Množství značeného

komplexu ( $\text{Ag}^*\text{-Ab}$ ) je nepřímo úměrné množství stanovovaného antigenu Ag, čili čím více stanovované látky LH se ve vzorku nacházelo, tím menší množství značeného komplexu vzniklo a tím menší byl výsledný signál. Sekreci a syntézu hormonů LH a FSH v gonadotropních buňkách kontroluje GnRH především tím, že vyvolává zvýšení koncentrace intracelulárních iontů  $\text{Ca}^{2+}$ . V poslední sérii pokusů jsem zjistila, že zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  v gonadotropních buňkách vyvolané aplikací extracelulárního ATP je také schopné stimulovat bazální sekreci LH a navýšit GnRH stimulovanou sekreci LH.

Z mých pokusů také vyplývá, že sekreci LH zvyšuje  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  mnohem méně než GnRH, a to přibližně na úroveň 31,03 % oproti aplikaci samotného GnRH. Pokud je však  $\text{ATP}\gamma\text{S}$ , aplikován společně s GnRH, sekrece LH se zvýší pouze o 7,24 % oproti aplikaci samotného GnRH. Tyto výsledky ukazují, že extracelulární ATP jako autokrinní a parakrinní signalizační molekula vzniklá na úrovni adenohypofýzy může mírně zastupovat účinek GnRH a v jeho nepřítomnosti zvyšovat bazální sekreci gonadotropních hormonů, což může udržovat v pohotovosti reprodukční systém. Účinek ATP však není aditivní ke specifickému maximálnímu účinku GnRH, a sekrece LH tak nemůže být v přítomnosti obou stimulatorů nadměrně zvýšena.

## 6 Závěr

Ve výsledcích předkládané diplomové práce jsem se dopracovala ke zjištění, že neonatální hypofyzární buňky reagují na extracelulární aplikaci ATP zvýšením koncentrace intracelulárních iontů vápníku a sekrecí hypofyzárních hormonů, že tyto účinky jsou zprostředkované purinergními receptory P2X a P2Y, a že neonatální hypofyzární buňky jsou citlivé na ATP méně než dospělé buňky. Možnými příčinami rozdílů mezi reakcemi neonatálních a dospělých sekrečních buněk adenohypofýzy mohou být, kromě rozdílů v expresi membránových receptorů P2X a P2Y, odlišných morfologických, sekrečních nebo biochemických vlastností, také rozdíly v mechanismech intracelulární  $\text{Ca}^{2+}$ -signalizace a odstraňování iontů  $\text{Ca}^{2+}$  z cytoplasmy. Neonatální gonadotropy reagují na GnRH nejen uvolňováním  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních zásob<sup>50</sup>, ale také zvýšením vstupu iontů  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky. V dospělé hypofýze je GnRH-signalizace zprostředkovaná  $\text{Ca}^{2+}$ -oscilacemi o vyšší frekvenci, které jsou méně závislé na koncentraci extracelulárních iontů vápníku<sup>43, 49</sup>. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že endoplasmatické retikulum dospělých gonadotropů efektivněji „vychytává“ ionty  $\text{Ca}^{2+}$  z cytoplasmy. Nižší exprese receptorů P2X v neonatální hypofýze by mohla být preventivním opatřením chránícím buňky před nadměrným vstupem iontů  $\text{Ca}^{2+}$  v přítomnosti extracelulárního ATP, protože jejich endoplasmatické retikulum nemá dostatečnou kapacitu tyto ionty odstranit z cytoplasmy.

## 7 Souhrn

Pomocí techniky měření fluorescence intracelulární sondy Fura-2 citlivé na koncentraci volných vápenatých iontů a také pomocí metody RIA, bylo v neonatálních buňkách adenohypofýzy potkana zjištěno, že:

- 1) smíšená populace neonatálních buněk adenohypofýzy potkana obsahuje purinergní receptory P2X a P2Y, a že na aplikaci extracelulárního ATP odpovídá zvýšením koncentrace intracelulárních iontů vápníku 69,1 % neonatálních hypofyzárních buněk. Dále bylo zjištěno, že na aplikaci GnRH odpovídá zvýšením koncentrace intracelulárních iontů vápníku 13,5 % buněk neonatální hypofýzy, tj. subpopulace gonadotropů, a na aplikaci TRH odpovídá 30,0 % neonatálních hypofyzárních buněk, které představují subpopulaci tyreotropů a laktotropů.
- 2) přibližně stejné množství GnRH- a TRH-citlivých buněk (82,76 % a 82,90 %) bylo sensitivních na aplikaci extracelulárního ATP, což naznačuje, že gonadotropy, tyreotropy a laktotropy neonatální potkaní hypofýzy obsahují ve vysokém a shodném procentu ve svých membránách purinergní receptory. Toto procento je však nižší než 92 % až 98 % uváděných v literatuře pro dospělé gonadotropy a laktotropy.
- 3) smíšená populace neonatálních hypofyzárních buněk potkana byla citlivá kromě ATP i k jiným agonistům purinergních receptorů, konkrétně k ADP, BzATP a 2MeSATP. Citlivost těchto buněk k agonistům klesala v pořadí  $ATP > 2\text{ MeSATP} > \text{BzATP} > \text{ADP}$ . Dále bylo zjištěno, že na aplikaci ADP odpovídalo zvýšením koncentrace intracelulárních iontů vápníku 46,2 % gonadotropů a 58,6 % TRH-citlivých buněk, tedy tyreotropů a laktotropů. To znamená, že tyreotropy a laktotropy v neonatální hypofýze potkanů exprimovaly receptory P2Y mnohem víc než gonadotropy nebo ostatní neidentifikované typy buněk adenohypofýzy.
- 4) inhibitory purinergních receptorů, PPADS a BDBD snižovaly ATP-stimulované zvýšení koncentrace intracelulárních iontů vápníku ve smíšené populaci neonatálních hypofyzárních buněk. Znamená to, že tato populace obsahovala receptory P2X<sub>2</sub> reagující na účinek antagonistu PPADS, ale také receptory P2X<sub>4</sub>,

kterých specifickým inhibítozem je BDBD, přičemž tyto receptory byly exprimovány víc v neonatálních tyreotropech a laktotropech než v gonadotropech.

5) nehydrolyzovatelný analog ATP, ATP $\gamma$ S zvyšuje sekreci LH průměrně o 11,14 % oproti bazální sekreci LH, která odpovídá 19,89 % z maximální sekrece stimulované GnRH. ATP $\gamma$ S aplikováno společně s GnRH napomáhá ještě k většímu zvýšení sekrece LH oproti sekreci LH způsobenou aplikací samotného GnRH a to průměrně o 7,24 %.

## Použitá literatura

---

- <sup>1</sup> Javorka, K. a kol.: Lekárska fyziológia. Učebnica pre lekárske fakulty. Osveta, Martin (2001)
- <sup>2</sup> Naor, Z., Harris, D., Shacham, S.: Front. Neuroendocrinol. 19, 1-19 (1998)
- <sup>3</sup> McArdle, C.A., Franklin, J., Green, L., Hislop, J.N.: J. Endocrinol. 173, 1-11 (2002)
- <sup>4</sup> Kraus, S., Naor, Z., Seger, R.: Arch. Med. Res. 32, 499-509 (2001)
- <sup>5</sup> Sun, Y., Lu, X., Gershengorn, M.C.: J. Mol. Endocrinol. 30, 87-97 (2003)
- <sup>6</sup> Kaiser, U.B., Katzenellenbogen, R.A., Conn, P.M., Chin, W.W.: Mol. Endocrinol. 8, 1038-1048 (1994)
- <sup>7</sup> Ralevic, V., Burnstock, G.: Pharmacol. Rev. 50, 413-492 (1998)
- <sup>8</sup> Tu, J., Wang, L.P.: Neurosci. Bull. 25, 27-32 (2009)
- <sup>9</sup> Bodin, P., Burnstock, G.: Neurochem. Res. 26, 959-969 (2001)
- <sup>10</sup> Born, G.V., Kratzer, M.A.: J. Physiol. 354, 419-429 (1984)
- <sup>11</sup> Tvrdonová, V.: Mezibuněčná a vnitrobuněčná úloha adenosin-5'-trifosfátu. Bakalářská práce PřF UK Praha, Klinická a toxikologická analýza (2008)
- <sup>12</sup> Jiang, L.H., et al.: J. Biol. Chem. 275, 34190-34196 (2000)
- <sup>13</sup> Zimmermann, H.: Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 362, 299-309 (2000)
- <sup>14</sup> Vávra, V.: Vliv extracelulárního ATP na změny intracelulárního vápníku v hypothalamických řezech potkana měřené pomocí mikrofluorimetrie. Diplomová práce Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, biologická fakulta (2005)
- <sup>15</sup> Berridge M. J., Bootman M. D., Roderick H. L.: Nature reviews – Mol. Cell. Biol. 4, 517-530 (2003)
- <sup>16</sup> Burnstock, G.: Br. J. Pharmacol. 147, S172-S181 (2006)

- 
- <sup>17</sup> Burnstock, G.: In: Straub R.W., Bolis, L. (eds) Cell membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach. Raven Press, New York, 107–118 (1978)
- <sup>18</sup> Fields, R.D., Burnstock, G.: Nat. Rev. Neurosci. 7, 423–436 (2006)
- <sup>19</sup> Olah, M.E., Stiles, G.L.: Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35, 581–606 (1995)
- <sup>20</sup> Stojilkovic S., He M., Koshimizu T., Balik A. and Zemkova H.: Mol. Cell. Endocrinol. 314, 184–191 (2010)
- <sup>21</sup> Fredholm, B.B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., Wasserman, W.: Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 362, 364–374 (2000)
- <sup>22</sup> Klotz, K.N.: Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 362, 382–391 (2000)
- <sup>23</sup> Burnstock, G.: Cell. Mol. Life Sci. 64, 1471–1483 (2007)
- <sup>24</sup> Burnstock, G., Kennedy, C.: Gen. Pharmacol. 16, 433–440 (1985)
- <sup>25</sup> Burnstock, G.: Curr. Top. Med. Chem. 4, 793–803 (2004)
- <sup>26</sup> Fisher W., Krugel, U.: Curr. Med. Chem. 14, 2429–2455 (2007)
- <sup>27</sup> Chen, Z.P., Kratzmeier, M., Levy, A., McArdle, C.A., Poch, A., Day, A., Mukhopadhyay, A.K., Lightman, S.L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 5219–5223 (1995)
- <sup>28</sup> Stojilkovic, S.S., Tomic M., He, M.L., Yan, Z., Koshimizu, T.A., Zemkova, H.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 1048, 116–130 (2005)
- <sup>29</sup> Khakh, B.S., North, A.: Nature. 442, 527–532 (2006)
- <sup>30</sup> Khakh, B.S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B.F., North, R.A., Séguéla, P., Voigt, M., Humphrey, P.P.A.: Pharmacol. Rev. 53, 107–118 (2001)
- <sup>31</sup> North, R.A.: Physiol. Rev. 82, 1013–1067 (2002)
- <sup>32</sup> Ennion, S.J., Evans, R.J.: Mol. Pharmacol. 61, 303–311 (2002)
- <sup>33</sup> Hattori, M., Gouaux, E.: Nature. 485, 207–212 (2012)
- <sup>34</sup> Vial, C., Roberts, J.A., Evans, R.J.: Trends Pharmacol. Sci. 25, 487–493 (2004)



- 
- <sup>35</sup> Stojilkovic, S.S., Koshimizu, T.: Trends Endocrinol. Metab. 12, 218-225 (2001)
- <sup>36</sup> Rees, D.A., Scanlon, M.F., Ham, J.: Clin.Science. 104, 467-481 (2003)
- <sup>37</sup> Chen, Z.P., Levy, A., Lightman, S.L.: Brain Res. 641, 249-256 (1994)
- <sup>38</sup> Van Der Merwe, P.A., Wakefield, I.K., Fine, J., Millar, R.P., Davidson, J.S.: FEBS Lett. 243, 333-336 (1989)
- <sup>39</sup> Chen, Z.P., Levy, A., McArdle, C.A., Lightman, S.L.: Endocrinol. 135, 1280-1283 (1994)
- <sup>40</sup> Chen, Z.P., Kratzmeier, M., Poch, A. et al.: Endocrinol. 137, 248-256 (1996)
- <sup>41</sup> Zemkova, H., Balik, A., Jindrichova, M., Vavra, V.: Physiol.Res. 57, S23-S38 (2008)
- <sup>42</sup> He, M.L., Gonzalez-Iglesias, A.E., Tomic, M., Stojilkovic, S.S.: Purinergic. Signal. 1, 135-144 (2005)
- <sup>43</sup> Stojilkovic, S.S.: Trends Endocrinol. Metab. 20, 460-468 (2009)
- <sup>44</sup> Zemkova, H., Balik, A., Jiang, Y., Kretschmannova, K., Stojilkovic, S.S.: Mol. Endocrinol. 20, 1423-1436 (2006)
- <sup>45</sup> Vavra, V., Jindrichova, M., Jelinkova, I., Zemkova, H.: Program No. 822.9/C8 2008 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2008. Online.
- <sup>46</sup> Koshimizu, T.A., Tomic, M., Wong, A.O., Zivadinovic, D., Stojilkovic, S.S.: Endocrinol. 141, 4091-4099 (2000)
- <sup>47</sup> Koshimizu, T.A., Kretschmannova, K., He, M.L., Ueno, S., Tanoue, A., Yanagihara, N., Stojilkovic, S.S., Tsujimoto, G.: Mol. Pharmacol. 69, 1588-1598 (2006)
- <sup>48</sup> Koshimizu, T.A., Van Goor, F., Tomic, M., Wong, A.O., Tanoue, A., Tsujimoto, G., Stojilkovic, S.S.: Mol. Pharmacol. 58, 936-945 (2000)
- <sup>49</sup> Zemkova, H., Vanecek, J.: Endocrinol. 141, 1017-1026 (2000)
- <sup>50</sup> Vanecek, J., Klein, D.C.: Endocrinol. 130, 701-707 (1992)
- <sup>51</sup> Vanecek, J.: Physiol. Rev. 78, 687-721 (1998)
- <sup>52</sup> Krinke, O., Novotná, Z., Valentová, O., Martinec, J.: Chem. Listy. 99, 231-235 (2005)

- 
- <sup>53</sup> Fišar, Z.: Fluorescenční spektroskopie v neurovědách; publikováno na internetu v roce 2003 <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfišar/fluorescence/Default.htm> ; s. 34, staženo 8.7.2013
- <sup>54</sup> Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D., Herman, B.: *Physiol. Rev.* **79**, 1089-1125 (1999)
- <sup>55</sup> The Molecular Probes Handbook, 11. vydání (USA), section 19.2.  
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>,  
staženo 3.3.2013
- <sup>56</sup> Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y.: *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450 (1985)
- <sup>57</sup> Radioimunoanalýza; publikováno na internetu:  
<http://orion.sci.muni.cz/virtuallab/dokumenty/pdf/Radioimunoanaliza.pdf>, staženo 19.10.2013
- <sup>58</sup> Radioimunologické metody; publikováno na internetu:  
<http://www.fjfi.cvut.cz/kjch/materialy/RCHP/RIA.PDF>, staženo 19.10.2013
- <sup>59</sup> Imunoreakce se značenými protilátkami; publikováno na internetu:  
[http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory\\_vyuka/imunoreakce.pdf](http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/imunoreakce.pdf), staženo 20.10.2013
- <sup>60</sup> He, M.L., Gonzalez-Iglesias, A.E., Stojilkovic, S.S.: *J. Biol. Chem.* **278**, 46270-46277 (2003)
- <sup>61</sup> North, R.A., Barnard, E.A.: *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 346-357 (1997)
- <sup>62</sup> Zemkova, H., Kucka, M., Li, S., Gonzalez-Iglesias, A.E., Tomic, M., Stojilkovic, S.S.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E644-E651 (2010)
- <sup>63</sup> Balázs, B., Danko, T., Kovacs, G., Koles, L., Hediger, M.A., Zsembery, A.: *Cell. Physiol. Biochem.* **32**, 11-24 (2013)